



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ-ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ»

Εργαστήριο Αμπελολογίας

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ ΚΑΟΛΙΝΗ ΣΤΑ ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΑΙ
ΠΟΣΟΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΑΜΠΕΛΟΥ (*Vitis vinifera* L.)
ΣΕ ΑΜΠΕΛΩΝΕΣ ΤΗΣ ΣΑΝΤΟΡΙΝΗΣ**

Μαργαρίτα Μ'Ανδροβικ



Επιβλέπουσα: Επίκουρη Καθηγήτρια Α. Μπινιάρη

Αθήνα 2019

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Επίδραση της εφαρμογής σκευάσματος Καολίνη στα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά ορισμένων ποικιλιών αμπέλου (*Vitis vinifera* L.) σε αμπελώνες της Σαντορίνης

Effect of kaolin foliar application on the qualitative and quantitative characters of grape cultivars Assyrtiko and Aidani (*Vitis vinifera* L.) under vineyard conditions

Μαργαρίτα Μ'Ανδροβικ

Επιβλέπουσα: Επίκουρη Καθηγήτρια Α. Μπινιάρη

Μέλη τριμελούς εξεταστικής επιτροπής:

Μπινιάρη Αικατερίνη, Επίκουρη Καθηγήτρια Εργ.
Αμπελολογίας, Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Παπαδάκης Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής Εργ.
Δενδροκομίας, Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Χατζηδημητρίου Μαριάννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Εργ.
Γενετικής Τμήματος Βιοτεχνολογίας Γεωπονικού Πανεπιστημίου
Αθηνών

Περίληψη

Ο άνυδρος αμπελώνας της Σαντορίνης, γνωστός για τη διαχρονικότητα και τα μοναδικά ηφαιστειογενή εδάφη του, συνιστά ένα σημαντικό παράγοντα αγροτικής ανάπτυξης, που έχει επηρεαστεί τα τελευταία χρόνια από την έντονη κλιματική αλλαγή. Στη παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκαν οι ποιοτικοί και ποσοτικοί χαρακτήρες των γηγενών ποικιλιών του Σαντορινιού αμπελώνα Ασύρτικο και Αηδάνι εξετάζοντας την επίδραση του διαφυλλικού ψεκασμού με την αντιδιαπνευστική ουσία Καολίνη για τη καλλιεργητική περίοδο 2017-2018. Πραγματοποιήθηκαν γλευκογραφικές μετρήσεις και μηχανικές αναλύσεις σε σταφυλή και σε ράγα, κατά την τεχνολογική ωριμότητα. Προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά στους φλοιούς και στα γίγαρτα των ραγών η περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά, καθώς και η αντιοξειδωτική τους ικανότητα, ενώ με τη χρήση φασματοφωτόμετρου μετρήθηκε επίσης και η συγκέντρωση του γλεύκους στα αμινοξέα αργινίνη και προλίνη. Παράλληλα, έγινε ποσοτικός προσδιορισμός μεμονωμένων οξέων του γλεύκους με τη χρήση της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η επίδραση του καολίνης επηρέασε θετικά τα περισσότερα φαινολικά συστατικά, κυρίως για τη ποικιλία Ασύρτικο. Διαφορές στις επεμβάσεις παρατηρήθηκαν και στις δύο ποικιλίες για τα σάκχαρα, την ολική οξύτητα και το pH, ενώ δεν φαίνεται να επηρεάστηκαν ιδιαίτερα οι μορφομετρικοί χαρακτήρες και το βάρος της σταφυλής και της ράγας.

Επιστημονική Περιοχή: Αμπελουργία

Λέξεις-κλειδιά: *Vitis vinifera* L., Ασύρτικο, Αηδάνι, καολίνης, φαινολικές ενώσεις, ταννίνες, φλαβονοειδή, φλαβανόλες, φλαβονόλες, φλοιοί, γίγαρτα, οργανικά οξέα, αντιοξειδωτικά, ο-διφαινόλες

Effect of kaolin foliar application on the qualitative and quantitative characters of grape cultivars Assyrtiko and Aidani (*Vitis vinifera* L.) under vineyard conditions

Abstract

The anhydrous vineyard of Santorini, known for its timelessness and unique volcanic lands, which is an important factor in rural development, has been significantly affected in recent years by climate change. This study examines the effect of kaolin foliar application on specific quantitative and qualitative characters of wine grape cultivars, Assyrtiko and Aidani (*Vitis vinifera* L.), which are indigenous to Santorini, during the cultivation period 2017-2018. More specifically, grape and berries mechanical properties were measured during technological maturity, while characters of the must (total soluble solids, total titratable acidity, pH) were determined. The content of total phenolic compounds and their antioxidant capacity were determined by spectrophotometric analysis in the berries' skin and seeds, while the concentration of must in the amino acids arginine and proline was also measured. The HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) method was used to determine the individual organic acids of the must. The results showed that the effect of kaolin has positively influenced most phenolic compounds, mainly for grape cultivar Assyrtiko. Differences in the applications were observed in both cultivars regarding total soluble solids, total acidity and pH, while the morphometric characters and the weight of grapes and berries did not appear to have been particularly affected.

Scientific field: Viticulture

Keywords: *Vitis vinifera* L., Assyrtiko, Aidani, kaolin, phenolic compounds, tannins, flavonoids, flavanols, flavonols, skins, seeds, organic acids, antioxidants, o-diphenols

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	3
1. Εισαγωγή.....	7
1.1 Η αμπελουργία στη Σαντορίνη.....	7
1.2 Ο αμπελώνας της Σαντορίνης.....	8
1.2.1 Γεωλογικά στοιχεία.....	12
1.2.2 Κλιματικά στοιχεία.....	13
1.3 Καολίνης.....	15
1.3.1 Καολίνης στην αμπελοκαλλιέργεια.....	16
1.4 Ανάπτυξη και ωρίμανση ραγών.....	17
1.5 Βιοσύνθεση και συγκέντρωση αμινοξέων.....	19
1.5.1 Βιοσύνθεση αργινίνης και προλίνης.....	21
1.5.2 Ο ρόλος των αμινοξέων στο γλεύκος και στον οίνο.....	22
1.6 Φαινολικές ενώσεις.....	23
1.6.1 Φλαβονοειδή.....	25
1.6.2 Βιοσύνθεση φλαβονοειδών.....	30
1.6.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την βιοσύνθεση των φαινολικών ενώσεων....	32
2. Υλικά και μέθοδοι.....	34
2.1 Ποικιλίες.....	34
2.2 Πειραματικός Αμπελώνας.....	34
2.3 Κλιματολογικές συνθήκες και τρύγος.....	35
2.4 Σχεδιασμός πειράματος.....	36
2.5 Δειγματοληψία και χειρισμός ραγών.....	37
2.6 Μηχανικές αναλύσεις σταφυλής και ράγας.....	38
2.6.1 Βάρος Σταφυλής.....	38
2.6.2 Μήκος και πλάτος σταφυλής.....	38
2.6.3 Μέσο βάρος ράγας.....	38
2.6.4 Μέσο μήκος και πλάτος ραγών.....	38
2.6.5 Ποσοστό υγρασίας και ξηράς ουσίας ράγας.....	38
2.7 Μετρήσεις γλευκογραφικών χαρακτηριστικών.....	39
2.7.1 Μέτρηση σακχαροπεριεκτικότητας (°Brix).....	39
2.7.2 Μέτρηση ενεργής οξύτητας(pH).....	39
2.7.3 Μέτρηση ολικής οξύτητας.....	40
2.8 Φασματοφωτομετρική μέτρηση αμινοξέων του γλεύκους.....	41

2.8.1	Μέτρηση της αργινίνης στο γλεύκος	41
2.8.2	Μέτρηση της προλίνης στο γλεύκος	44
2.9	Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών στους φλοιούς στα γίγαρτα και στα γλεύκη με τη μέθοδο της φασματοφωτομετρίας.....	46
2.9.1	Προετοιμασία δειγμάτων.....	46
2.10	Μέτρηση ολικών φαινολικών ενώσεων με τη μέθοδο ILAND	49
2.11	Μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών.....	51
2.12	Μέτρηση ολικών флаβονοειδών ενώσεων	53
2.13	Μέτρηση των ολικών флаβανολών	55
2.14	Μέτρηση ολικών флаβονών και флаβονολών	57
2.15	Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας.....	58
2.16	Μέτρηση ολικών ο-διαφινολών.....	60
2.17	Προσδιορισμός μεμονωμένων οξέων με HPLC.....	62
2.18	Στατική ανάλυση	63
3.	Αποτελέσματα	64
3.1	Μετρήσεις γλευκογραφικών χαρακτηριστικών	64
3.2	Μηχανικές αναλύσεις σταφυλής και ράγας	65
3.3	Μετρήσεις μεμονωμένων οξέων με HPLC	66
3.4	Φασματοφωτομετρικές αναλύσεις.....	67
3.4.1	Μετρήσεις συμπυκνωμένων ταννινών	67
3.4.2	Μετρήσεις ολικών флаβονοειδών.....	68
3.4.3	Μετρήσεις ο-διφαινολών.....	69
3.4.4	Μετρήσεις ολικών флаβανολών.....	69
3.4.5	Μετρήσεις ολικών φαινολικών	70
3.4.6	Μετρήσεις ολικών флаβονών και флаβονολών.....	70
3.4.7	Μετρήσεις αντιοξειδωτικής ικανότητας	71
4.	Συμπεράσματα	72
5.	Βιβλιογραφία.....	74

1. Εισαγωγή

1.1 Η αμπελουργία στη Σαντορίνη

Η Σαντορίνη ή Θήρα, μαζί με την Ανάφη, είναι το νοτιότερο νησί των Κυκλάδων. Το νησί πριν τη Μινωϊκή έκρηξη ονομαζόταν Στρογγυλή λόγω του σχήματος του. Η καταστροφική έκρηξη που χρονολογείται το 1610(+_10 χρόνια) είχε ως αποτέλεσμα τη καταστροφή της Στρογγύλης σε τέτοια έκταση ώστε σήμερα να υπάρχουν μόνο τα κατάλοιπα του αρχικού νησιού που περικλείουν στο κέντρο τους μια περιοχή πλημμυρισμένη από θάλασσα. Οι παρυφές της Καλδέρας είναι τα νησιά Θήρα Θηρασιά και Απρονήσι ενώ στο κέντρο της καλδέρας βρίσκονται η Παλαιά και η Νέα Καμένη. Σύμφωνα με τις ανασκαφές του Ακρωτηρίου, είναι πολλές οι ενδείξεις που μαρτυρούν την καλλιέργεια της αμπέλου, αλλά και της οινοποίησης στην προϊστορική εποχή. Στις ανασκαφές έχουν βρεθεί κάρβουνα από ξύλα αμπέλου, αλλά και γίγαρτα σκόρπια μέσα στα ερείπια του οικισμού. Επίσης, σταφυλές έχουν χρησιμοποιηθεί ως διακοσμητικά θέματα στην αγγειογραφία της εποχής.

Σαφείς μαρτυρίες για το ποιος εισήγαγε την αμπελοκαλλιέργεια μετά τη βιβλική καταστροφή της έκρηξης του ηφαιστείου κατά την εποχή του Χαλκού , δεν υπάρχουν. Την περίοδο της Ενετοκρατίας 1207-1566 υπάρχουν πολλές μαρτυρίες

ξένων περιηγητών ότι το νησί ήταν κατάφυτο με αμπέλια και παρήγαγε εξαιρετικής ποιότητας οίνους με κορυφαίο το *Vino Santo – Vinsanto*, το λιαστό γλυκό κρασί της Σαντορίνης, ενώ πιο συγκεκριμένα κατά την Τουρκοκρατία είναι γνωστό ότι καλλιεργούνταν στη Σαντορίνη 5.937 στρέμματα. Το εξαγωγικό εμπόριο του κρασιού άνθισε από εκείνη την εποχή έως τα τέλη του 19^{ου} αιώνα και είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη της ναυτιλίας και την ευπορία των κατοίκων του νησιού. Ο αμπελώνας της Σαντορίνης θεωρείται ο αυθεντικός πανάρχαιος με ριζικό σύστημα που χρονολογείται περίπου στα 3500 χρόνια. Στα μέσα του 19^{ου} αιώνα το έντομο φυλλοξήρα εξαπλώθηκε στη κεντρική Ευρώπη από τη βόρειο Αμερική καταστρέφοντας τους ευρωπαϊκούς αμπελώνες. Μοναδική αντιμετώπιση του φαινομένου ήταν ο εμβολιασμός των αμπελιών με ανθεκτικές αμερικάνικες ποικιλίες. Στην Ελλάδα η φυλλοξήρα έφτασε το 1890 αρχικά στα νησιά του ανατολικού Αιγαίου. Όμως, στη Σαντορίνη η φυλλοξήρα δεν κατάφερε να επιβιώσει καθότι η έλλειψη αργιλίου η μεγάλη περιεκτικότητα σε άμμο (93-97%) και το αυξημένο ποσοστό Πυριτίου(67%) δημιουργούν εχθρικό περιβάλλον για τη ριζόβια μορφή της Φυλλοξήρας. Αυτό το περιβάλλον αποτέλεσε ανασταλτικό παράγοντα στην εγκατάσταση και στην ανάπτυξη του εντόμου.

1.2. Ο αμπελώνας της Σαντορίνης

Ο ιδιόμορφος Σαντορινιός αμπελώνας είναι γνωστός καταρχάς για τα μοναδικά ηφαιστειογενή εδάφη του. Από τα πιο χαρακτηριστικά σημεία του μικροκλίματος στο νησί αυτό είναι η μεγάλη ανομβρία οι ελάχιστες βροχοπτώσεις και οι σαρωτικοί άνεμοι. Κατά τους καλοκαιρινούς μήνες οι θαλάσσιες ομίχλες από τη καλντέρα κατά τις νυχτερινές ώρες ενυδατώνουν τα αμπέλια προσφέροντας τους την απαραίτητη υγρασία. Κατά αυτό τον τρόπο ενυδατώνεται το έδαφος σε συνθήκες έλλειψης βροχοπτώσεων καθότι τα αμπέλια στη Σαντορίνη δεν αρδεύονται. Οι αντίξοες κλιματικές συνθήκες και ιδιαίτερα οι ισχυροί βοριάδες υποχρέωσαν τους αμπελουργούς να υιοθετήσουν ιδιαίτερα συστήματα κλαδέματος προκειμένου να προφυλάσσονται τα σταφύλια(Κουράκου 2015). Πιο συγκεκριμένα στη Σαντορίνη εφαρμόζονται 2 παραδοσιακά συστήματα κλαδέματος με τα οποία ο αμπελουργός διαμορφώνει τα πρέμνα των κλημάτων του αμπελιού του. Το πρώτο σύστημα είναι το «κυππελοειδές γυριστό ή στεφανωτό», όπου ο αμπελουργός μετά από 3-4 χρόνια κλαδέματος σε χαμηλό κύπελλο αφαιρεί όλες τις κληματίδες διατηρώντας μία αμολυτή σε κάθε βραχίονα, την οποία πλαγιάζει οριζόντια σχηματίζοντας ένα στεφάνι το οποίο ολοκληρώνεται και με την εναλλάξ περιέλιξη των υπολοίπων κληματίδων γύρω από τους βραχίονες. Συνεχίζοντας με αυτό τον τρόπο επί 15 ως 20 χρόνια σχηματίζεται ένα καλάθι το οποίο αναφέρεται ως αμπελιά ή κουλούρα.



Εικ. 1 Αμπελώνας στη Σαντορίνη (2018)



Εικ. 2 Σαντορινιά Κουλούρα (2018)



Εικ. 3 Σαντορινιά Κουλούρα (2016)

Στο δεύτερο σύστημα << κυπελλοειδές με κουλούρια ή πόστες>> το ύψος του κορμού είναι μεγαλύτερο ενώ ο τελικός σχηματισμός φανερώνει ένα κουλούρι κάθετο στην επιφάνεια του εδάφους. Αυτό το σύστημα προτιμάται σε ποικιλίες με κληματίδες με μεγάλη ελαστικότητα όπως το Ασύρτικο, και εφαρμόζεται σε αμπελώνες που δεν είναι εκτεθειμένοι σε σφοδρούς ανέμους.



Εικ. 4 Πόστα (2016)

Η έκταση του αμπελώνα σήμερα είναι 12.000 στρέμματα ενώ η μέση απόδοσή του είναι μόλις 250-300 κιλά/στρέμμα, κάτι το οποίο μεταβάλλεται από χρονιά σε χρονιά. Βασική ποικιλία του αμπελώνα είναι το Ασύρτικο το οποίο παρουσιάζει μεγάλη προσαρμοστικότητα στα διάφορα εδαφοκλιματικά περιβάλλοντα της χώρας με τη βέλτιστη έκφραση της ποιότητας στο ιδιόμορφο περιβάλλον του νησιού της Σαντορίνης. Η ποικιλία αυτή καταλαμβάνει 13.000 στρέμματα στην Ελλάδα και το 65% συγκεντρώνεται στην Σαντορίνη (Olivier Etcheverria, 2014) Το Ασύρτικο συμπληρώνουν οι δύο άλλες βασικές λευκές ποικιλίες του Σαντορινιού αμπελώνα, το Αθήρι και το Αηδάνι από την συναινοποίηση των οποίων προκύπτουν οι οίνοι Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) Σαντορίνη , Νυχτέρι, καθώς και ο φυσικώς γλυκός οίνος Vinsanto. Πρόσφατα εγγράφηκε η αμπελοϊνική παράδοση και ο ιδιαίτερος τρόπος με τον οποίο καλλιεργούνται οι αμπελώνες της Σαντορίνης και της Θηρασίας, στο Εθνικό Ευρετήριο της Άυλης Πολιτιστικής Κληρονομιάς της Ελλάδας με τίτλο εγγραφής “Η αμπελοϊνική κληρονομιά της Σαντορίνης (Θήρας-Θηρασίας)”. Η Σαντορίνη είναι η πρώτη ζώνη παραγωγής οίνων (ΠΟΠ) που εντάσσεται στο Εθνικό Ευρετήριο της Άυλης Πολιτιστικής Κληρονομιάς (ΑΠΚ), ενώ παράλληλα ανοίγει ο δρόμος για τη διαδικασία ένταξης στον κατάλογο Άυλης Πολιτιστικής Κληρονομιάς της UNESCO.

1.2.1. Γεωλογικά στοιχεία

Η δε λειμωνία και έφαμμος (γη) αμπελοφόρος αγαθή και όλως ήτις άν ή μανή και κούφη και λεπτή και έφυδρος... Θεόφραστος, "Περί φυτών αιτιών Β', 4.4."

Το έδαφος αποτελεί τον πλέον μελετημένο παράγοντα, σχετικά με την επίδραση του στη θρέψη και ανάπτυξη του αμπελιού. Από την εποχή του Θεόφραστου (370-287 π.Χ.) είναι γνωστό ότι: "το λειμώνιο και αμμώδες έδαφος είναι καλό για τα αμπέλια και γενικά αν είναι αραιής σύστασης, ελαφρύ, λεπτό και με υγρασία

Τον 17ο αιώνα πΧ με την έκρηξη του ηφαιστείου αναβλήθηκαν τεράστιες ποσότητες ελαφρόπετρας, τέφρας, ηφαιστειακής άμμου και στερεοποιημένης λάβας. Σε όλη την έκταση του νησιού σχηματίστηκαν μαύροι και κόκκινοι λίθοι διαφορετικών μεγεθών με τις οποίες χτίζονται οι ξεροληθιές που συγκρατούν το έδαφος και το νερό στις πεζούλες. Η συσσωμάτωση ηφαιστειακών αναβλημάτων οδήγησε στο σχηματισμό της θηραϊκής γης (άσπα), η οποία πετρογραφικά χαρακτηρίζεται ως <<τόφος ανδεσιτικός>>. Το έδαφος φτάνει στα πεδινά σε πάχος τα 40 m, αλλά στα ορεινά έχει μειωθεί λόγω της διάβρωσης, ενώ αποτελείται κυρίως από 3 ειδη:

1. Άσπα, ένα είδος γης από ελαφρόπετρα, συνεκτική και ιδιαίτερα συμπαγής η οποία διατηρεί την υγρασία του εδάφους σε ικανοποιητικό επίπεδο και τη κάνει άμεσα διαθέσιμη.
2. Τζακάλι , πετρώδης και συμπαγής γη ,εξίσου σημαντικό με την άσπα το οποίο βελτιώνει πολύ την ποιότητα των σταφυλιών, αυξάνοντας τη γονιμότητα του εδάφους. Βρίσκεται διάσπαρτα σε διάφορα μέρη του νησιού πάνω η ανάμεσα σε δύο επίπεδα (κυρίως) άσπας σε οριζόντια διάταξη.
3. Υπάρχει κι ένα τρίτο είδος πετρώματος αμμώδες και τεφρώδες το οποίο έχει γκριζομαυρο χρώμα αλλά είναι χαμηλότερης γονιμότητας σε σχέση με τα άλλα δύο.

Το έδαφος επηρεάζεται ελάχιστα από τα μητρικά στρώματα, τα οποία αποτελούνται από ημικρυσταλλικούς ασβεστόλιθους και σχιστόλιθους. Όσο αφορά την μηχανική του σύσταση, το έδαφος της Σαντορίνης χαρακτηρίζεται αμμώδες, δηλαδή έχει ελαφριά σύσταση.. Σε ορισμένα σημεία είναι αμμοπηλώδες εξαιτίας του αρχικού ασβεστόλιθου που δίνει αυξημένα ποσά πηλού. Η περιεκτικότητα σε άργιλο είναι μικρή(άργιλος <5%) ενώ όλα τα εδάφη είναι κορεσμένα με βάση δηλαδή είναι εδάφη αλκαλικά με pH που κυμαίνεται από 7,20 έως 8,90. Γενικά το έδαφος του νησιού χαρακτηρίζεται από καλή εδαφική δομή και από ικανοποιητική περιεκτικότητα σε θρεπτικά στοιχεία όπως Κ (κάλιο) και σε Ιχνοστοιχεία. Αντίθετα έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε Ν (άζωτο) καθώς και σε οργανική ουσία(5%), ενώ είναι οριακή η συγκέντρωση σε Ρ (φώσφορο).

Το υπέδαφος είναι συμπαγές και αδιαπέραστο από τις ρίζες των περισσότερων φυτών, που περιορίζονται σε ένα μικρό στρώμα επιφανειακού εδάφους, ενώ σε μεγάλο βάθος δεν έχουν βρεθεί αποτυπώματα ριζών που να μαρτυρούν την ύπαρξη

ξυλώδων φυτών με βαθύτερες ρίζες εκτός από τη συκιά και το αμπέλι που παρουσιάζει τη μέγιστη προσαρμοστικότητα.

Τα μη ηφαιστειογενή εδάφη του νησιού τα οποία είναι ασβεστολιθικά και επιτρέπουν τη διείσδυση των ριζών, δεν έχουν τη δυνατότητα συγκράτησης υγρασίας δυσχεραίνοντας τη βλάστηση άλλων φυτών.

1.2.2. Κλιματικά στοιχεία

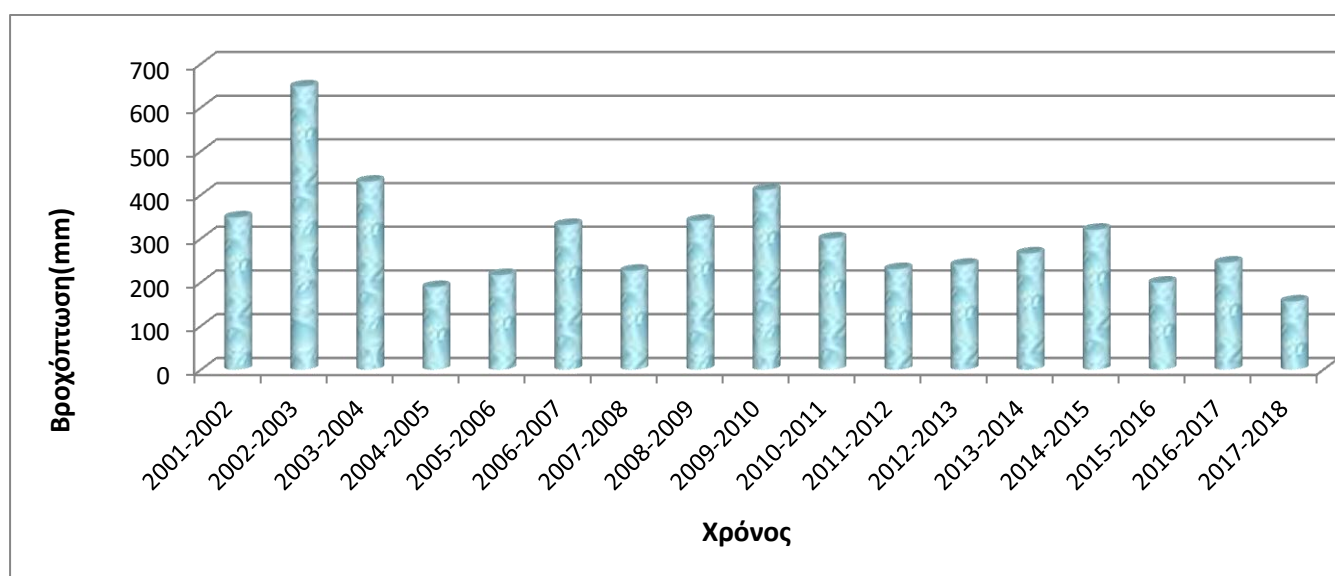
Το κλίμα της Σαντορίνης είναι μεσογειακό με κύριο χαρακτηριστικό το ξηρό και θερμό καλοκαίρι και τον ήπιο και βροχερό χειμώνα, χαρακτηρίζεται από μικρό ύψος βροχοπτώσεων (130 -400mm), ισχυρούς ανέμους και δροσερό, αλλά θερμό καλοκαίρι. Κατά τους καλοκαιρινούς μήνες συγκεκριμένα παρατηρούνται θαλάσσιες ομίχλες οι οποίες αρχίζουν από τα μέσα Ιουνίου και διαρκούν όλη την καλοκαιρινή περίοδο προσφέροντας αρκετή ποσότητα νερού ιδιαίτερα κατά τις νυχτερινές ώρες. Αυτό αποδεικνύεται από τις άφθονες σταγόνες νερού που παρατηρούνται στις ράγες τις πρώτες πρωινές ώρες. Επιφανειακά (έως 50cm) το πορώδες έδαφος του νησιού απορροφά το νερό της ομίχλης και για αυτό το λόγο τα κλήματα της Σαντορίνης διαθέτουν πολλά επιφανειακά ριζίδια. Οι ισχυροί άνεμοι και ο καυτός ήλιος κατά το θέρος στεγνώνουν τα σταφύλια από την υγρασία, αφαιρώντας τον κίνδυνο ανάπτυξης ασθενειών όπως το ωίδιο και βοτρυτή.



Εικ. 5 θαλάσσια ομίχλη στην Καλδέρα

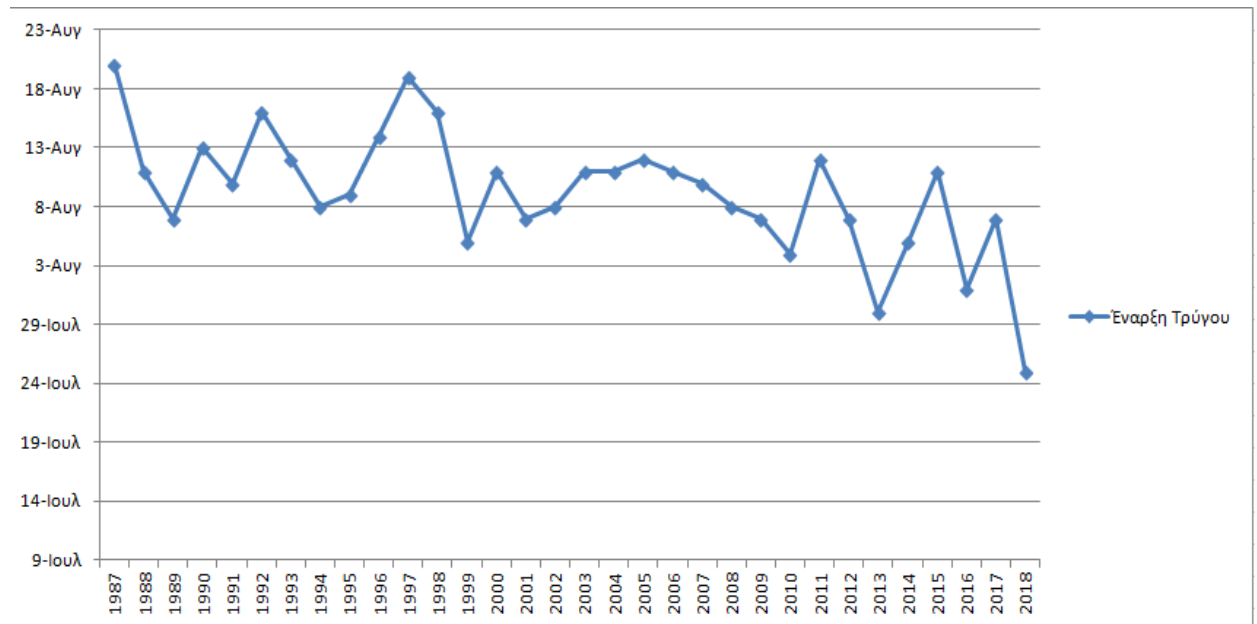
Κλιματική αλλαγή

Η κλιματική αλλαγή τα τελευταία χρόνια έχει επηρεάσει ιδιαίτερα τον ήδη ξηρομορφικό χαρακτήρα της Σαντορίνης. Η αύξηση της θερμοκρασίας και η έλλειψη βροχοπτώσεων έχουν οδηγήσει σε πρωίμηση της συγκομιδής τα τελευταία χρόνια, ενώ ο χρόνος από τον περκασμό ως την ωρίμανση του καρπού, μια κρίσιμη φάση για το φυτό καθότι τελούνται πολλές βιοχημικές διαδικασίες έχει μειωθεί σημαντικά.



Εικ. 6 συνολική βροχόπτωση της καλλιεργητικής περιόδου σε συνάρτηση με το χρόνο από το 2001 μέχρι το 2018.

Στο παραπάνω διάγραμμα γίνεται φανερό ότι η συνολική βροχόπτωση της καλλιεργητικής περιόδου για την Σαντορίνη τα τελευταία 17 χρόνια εμφανίζει αξιοσημείωτη μείωση ενώ ο μέσος όρος ανέρχεται στα 200-300 mm και μόνο 3 χρονιές παρουσίασαν διαφορετικές τιμές. Στο επόμενο διάγραμμα σημειώνεται η συνεχής πρωίμηση του τρύγου συγκεκριμένα για τη ποικιλία Ασύρτικο στη Σαντορίνη τα τελευταία 30 έτη, αποδεικνύοντας πόσο έχει επηρεάσει η αλλαγή του κλίματος την αμπελοκαλλιέργεια στο νησί.



Εικ. 7 έναρξη τρύγων από το 1987 μέχρι το 2018

1.3 Καολίνης

Ο καολινίτης αποτελεί μια απ τις τρεις κατηγορίες των αργλικών ορυκτών και συγκεκριμένα ανήκει στα φυλοπυριτιτικά ορυκτά, με μέγεθος μικρότερο από 2μm. Κάθε στρώμα του αποτελείται από δύο φύλλα, ένα φύλλο οκταέδρων του αργιλίου και ένα φύλλο τετραέδρων του πυριτίου σε αναλογία 1:1. Παρουσιάζει χαμηλή ιοντοαλλακτική χωρητικότητα, ενώ διαθέτει μικρή ικανότητα προσρόφησης ύδατος καθότι αναπτύσσονται ισχυροί δεσμοί μεταξύ των στρωμάτων του (Στυλιανού, Μ. 2012). Ο καολίνης είναι ένας από τους έξι εμπορικούς τύπους αργίλων οποίος περιλαμβάνει κυρίως καολινίτη. Ο καολίνης χρησιμοποιείται ευρέως ως οικολογικό φυτοπροστατευτικό καθότι, η κολλοειδής σκόνη του ψεκαζόμενη στη φυτική επιφάνεια δημιουργεί μία λεπτή άσπρη υδροφοβική μεμβράνη που δρα απωθητικά τόσο στη σίτιση, όσο και την ωστοκία των επικείμενων εχθρών του φυτού. Το λευκό στρώμα από καολίνη στη φυλλική επιφάνεια των φυτών φαίνεται ότι προστατεύει αρκετές καλλιέργειες (μηλοειδή, εσπεριδοειδή, αμπέλι,) από αβιοτικές καταπονήσεις όπως θερμικό στρες και ηλιοεγκαύματα. (Glenn et al. 2001, Glenn et al. 2010) μειώνοντας τη θερμοκρασία των φύλλων και αντανακλώντας τις IR UV ακτινοβολίες, ενώ φαίνεται να επιδρά στην αύξηση της στοματικής αγωγιμότητας και παράλληλη μείωση της αποδοτικότητας χρήσης νερού στη μηλιά και στην ιτιά (Glenn et al. 2010, Glenn et al. 2000)

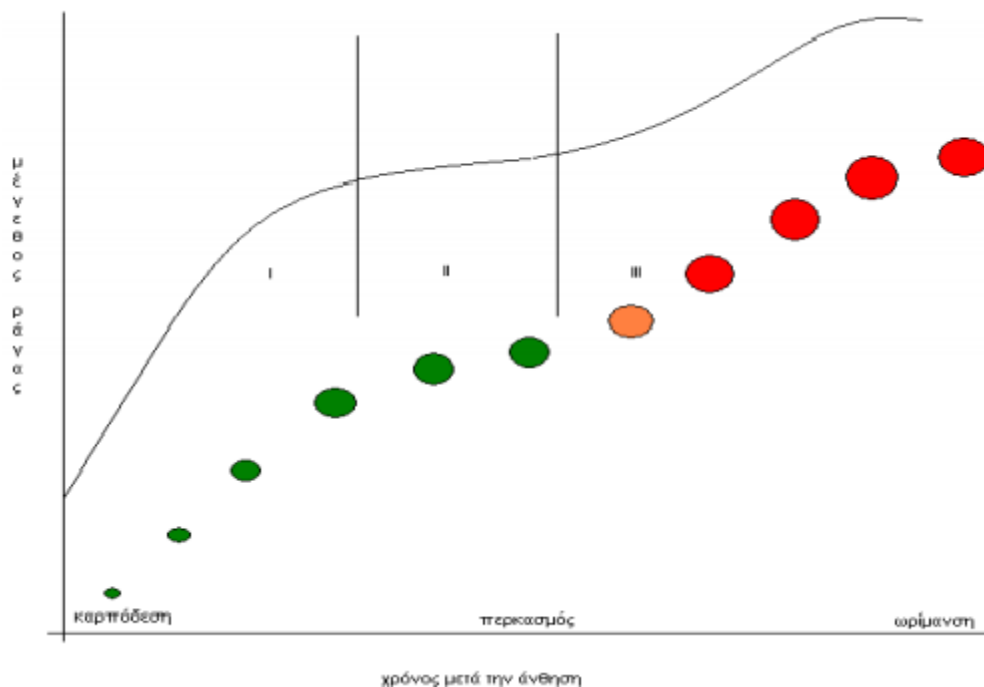
1.3.1 Καολίνης στην αμπελοκαλλιέργεια

Οι εξαιρετικά υψηλές θερμοκρασίες και η έλλειψη βροχοπτώσεων σε αρκετές καλλιεργητικές περιοχές όπως η Σαντορίνη, έχει μειώσει σημαντικά τη παραγωγικότητα πολλών φυτών όπως το αμπέλι. Η ανάγκη αντιμετώπισης των αβιοτικών παραγόντων μέσω εφαρμογής οικολογικών και οικονομικών μεθόδων βρίσκεται σε εξέλιξη και μελετάται συνεχώς. Ο καολίνης αποτελεί μία οικονομική πρόταση η οποία έχει εφαρμοστεί σε αρκετές καλλιέργειες δίνοντας θετικά αποτελέσματα. Ο ψεκασμός με σκόνη καολίνη, συμβάλλει στη καταπολέμηση του ωιδίου στην άμπελο, μετά από ανάμειξη του με μίγμα θείου καθότι διευκολύνεται η διαλυτοποίηση της σκόνης του θείου και μειώνεται η φυτοτοξικότητά του σε υψηλές θερμοκρασίες (Constant, N. 2007) . Επιπρόσθετα φαίνεται ότι περιορίζει την ανάπτυξη του βακτηρίου *Xylella fastidiosa* ,που προκαλεί την ασθένεια Pierce στο αμπέλι. (Tubajika et al. 2007). Παράλληλα, Το φίλμ με καολίνη που καλύπτει τα φύλλα της αμπέλου έχει δείξει ότι μειώνει τη καταπόνηση του φύτου σε υψηλές θερμοκρασίες αντανακλώντας τις βλαβερές IR και UV ακτινοβολίες χωρίς να επηράζει τη φωτοσύνθεση και την ανταλλαγή αερίων. (Glenn, D.M. 2009). Σημαντική είναι η επίδραση του προστατευτικού επιστρώματος με καολίνη στη μείωση της θερμοκρασίας του φύλλου στην μεταβολή της στοματικής αγωγιμότητας και την αύξηση της αποδοτικής χρήσης νερού (WUE) , παρόλο που φαίνεται ότι είναι διαφοροποιείται ανάλογα με τη ποικιλία, το σύστημα άρδευσης και τον εδαφικό τύπο. Ο καολίνης επιδρά στα χαρακτηριστικά του γλεύκους και της σταφυλής (ολικά σάκχαρα, ογκομετούμενη οξύτητα και pH) και αυτή η επιρροή σχετίζεται με τη ποικιλία. Πιο συγκεκριμένα η επέμβαση με καολίνη δείχνει να καθυστερεί την ωρίμανση σε ποικιλία όπως το Cabernet Sauvignon ενώ σε άλλες όπως το Merlot' και το 'Viognier' να μην έχει καμία επίδραση (Glenn et al. 2010).

Οι Shellie and Glenn (2008) διαπιστώνουν ότι η εφαρμογή με καολίνη συνδιάζεται με μία σημαντική αύξηση στο μέγεθος της ράγας στο 'Merlot' και με αύξηση της περιεκτικότητας σε σάκχαρα για το 'Viognier', προτείνοντας ότι η επέμβαση έχει αντίκτυπο στην απόδοση των πρέμνων. Συμφωνα με τους ερευνητές η ολική οξύτητα και τα διαλυτά στερεά (Brix) επηρεάζονται πολύ λίγο από άλλους παράγοντες στην περίπτωση της εφαρμογής με καολίνη καθότι παρουσιάζουν μεγαλύτερη συσχέτιση σε σχέση με σχέση με τα δείγματα χωρίς επέμβαση. Ο ψεκασμός με καολίνη φαίνεται να έχει επίδραση στα χημικά συστατικά της ράγας. Οι ολικές ανθοκυάνες των ραγών της ποικιλίας Merlot παρουσίασαν ποσοτική αύξηση, ενώ τα πτητικά συστατικά και τα ολικά φαινόλινα στην ίδια ποικιλία δεν φαίνεται να επηρεάζονται από τον καολίνη (Song et al. 2012). Παρόμοιες έρευνες αναφέρουν συνολική αύξηση στις ολικές φαινόλες στα φλαβονοειδή, , μέσω ελέγχου των γονιδίων που κωδικοποιούν τα κύρια ένζυμα του δευτερογενούς μεταβολισμού. (Dinis et al. 2016, Conde A et al. 2015). Εξίσου σημαντική επίδραση παρουσιάζει Η εφαρμογή με καολίνη στην αντιοξειδωτική ικανότητα των ραγών μέσω μείωσης του ποσοστού των ROS και των υδροξυλίων στις ράγες και τα φύλλα, (Dinis et al. 2016a, Dinis et al. 2016b).

1.4 Ανάπτυξη και ωρίμανση ραγών

Η ανάπτυξη της ράγας, στις εγγίγαρτες ποικιλίες αμπέλου παρουσιάζει δύο διακεκριμένες φάσεις (I και III) ταχύτατης ανάπτυξης της ράγας που διακόπτονται από μια φάση (II) επίσχεσης του ρυθμού αύξησης, ώστε τελικά η καμπύλη του αριθμού αύξησης των ραγών να είναι διπλή σιγμοειδής. (Σταυρακάκης, 1991)



Εικ. 8 Η πορεία ανάπτυξης των ραγών (Σταυρακάκης, 1991)

Οι τρεις φάσεις που παρατηρούνται είναι οι εξής:

Στάδιο I : Αρχική φάση της ανάπτυξης της ράγας (περίπου 60 ημέρες) κατά την οποία παρατηρείται ταχύτατη αύξηση σε μέγεθος, έντονη κυτταροδιαίρεση, η οποία σταματάει 5-6 εβδομάδες μετά την άνθιση. Η κυτταρική μεγέθυνση αρχίζει 2 εβδομάδες μετά την άνθιση και συνεχίζεται μέχρι το τέλος της φάσης. Παρατηρείται υψηλή συγκέντρωση ορμονών αύξησης, αρχικά αυξίνης, κι ακολούθως γιββερελλινών και κυτοκινινών, που εξαρτάται από τον αριθμό των γιγάρτων. Στο στάδιο 1 αρχίζει η συσσώρευση του τρυγικού και του μηλικού, ενώ οι συγκεντρώσεις των σακχάρων είναι ακόμα χαμηλές (Keller, M. 2010). Το τρυγικό εμφανίζει μέγιστη συγκέντρωση στους φλοιούς, ενώ το μηλικό στη σάρκα. Παράλληλα παρατηρείται και βιοσύνθεση των υδροξυκιναμωμικών οξέω και των ταννινών . Η τροφοδοσία της ράγας σ' αυτό το στάδιο διεξάγεται τόσο από το φλοιώμα όσο και από το ξύλωμα, ενώ διαπιστώνεται έντονη μεταβολική δραστηριότητα

Στάδιο II : Περίοδος επίσχεσης του ρυθμού ανάπτυξης (lag phase) κατά την οποία μειώνεται ο ρυθμός αύξησης και ανάπτυξης των ραγών και αυξάνεται ο ρυθμός ανάπτυξης των γιγάρτων, τα οποία αποκτούν το τελικό τους μέγεθος πριν τον περκασμό. Στην αρχή αυτού του σταδίου οι ράγες έχουν το μισό από το τελικό τους μέγεθος. Η κυτταροδιαίρεση συνεχίζεται, όπως και η βιοσύνθεση των οξέων και των ταννινών, με μέγιστη συσσώρευση λίγο πριν τον περκασμό (Kennedy, J. 2002). Προς το τέλος της περιόδου αυτής μειώνεται η σύνθεση ρυθμιστών της αύξησης και αυξάνεται το αμπισικό οξύ.

Στάδιο III : περίοδος ταχύτατης ανάπτυξης όπου ο ρυθμός αύξησης των ραγών ακολουθεί ανοδική πορεία μέχρι την ωρίμανση αυτών. Η Τρίτη φάση αρχίζει με τον περκασμό, όπου γυαλίζει» ο φλοιός (στις έγχρωμες ποικιλίες εμφανίζεται το χρώμα). Αυξάνεται η ελαστικότητα του φλοιού, οι ράγες γίνονται πιο μαλακές, αποκτούν το τελικό τους μέγεθος. Η ένταση της αναπνοής μειώνεται στη σάρκα και στα γίγαρτα και παρατηρείται συσσώρευση και αποθήκευση των σακχάρων στις ράγες και αντίστοιχη μείωση των οξέων, ιδιαίτερα του μηλικού σε περιοχές με θερμό κλίμα. Η τροφοδοσία της ράγας διεξάγεται μόνο από το φλοιώμα, ενώ διακόπτεται η σύνδεση από το ξύλωμα. βιοσύνθεση των ταννινών στους φλοιούς και στα γίγαρτα μειώνεται καθώς αρχίζει η βιοσύνθεση των ανθοκυανών στις έγχρωμες ποικιλίες, και των πτητικών συστατικών όπως τα τερπενοειδή στις λευκές. Μετά τον περκασμό αυξάνεται η συγκέντρωση στα ανάγοντα σάκχαρα φρουκτόζη και γλυκόζη και μειώνεται το ποσοστό της σακχαρόζης. οι δευτερογενείς μεταβολίτες συσσωρεύονται στις ράγες, αυτό το στάδιο, και τα πτητικά συστατικά των λευκών ποικιλιών.

1.5 Βιοσύνθεση και συγκέντρωση αμινοξέων

Το σημαντικότερο στοιχείο για την αύξηση (βλαστών και ράγας), τη διαφοροποίηση ανθέων, την καρπόδεση και την παραγωγή, είναι το άζωτο. Το άζωτο αλλάζει μορφές περνώντας διαδοχικά από την αέριο κατάσταση σε ανηγμένα ιόντα προτού εντέλει ενσωματωθεί σε οργανικές ενώσεις. Το έδαφος του αμπελώνα διαθέτει το άζωτο σε οργανικές (πρωτεΐνες αμινοξέα) και ανόργανες μορφές (νιτρική, αμμωνιακή). Το ριζικό σύστημα των πρέμνων απορροφά άζωτο από το εδαφικό διάλυμα σε αμμωνιακή ή νιτρική μορφή. Η αφομοίωση των νιτρικών γίνεται με αναγωγή πρώτα σε νιτρώδη μετά σε αμμωνιακά και τέλος ενσωμάτωση σε αμινοξέα. Τα αμινοξέα, αποτελούν την κύρια μορφή διακίνησης και αποθησαυρισμού του N στην άμπελο (Σταυρακάκης, 2013).

Οι ρίζες των φυτών απορροφούν ενεργά τα νιτρικά από το εδαφικό διάλυμα μέσω διαφόρων συµμεταφορέων νιτρικών-πρωτονίων και τα ανάγουν σε νιτρώδη με το ένζυμο νιτρική αναγωγάση (Μελετίου, 2012). Η Νιτρική αναγωγάση βρίσκεται στο κυτόπλασμα των κυττάρων της ρίζας (κυρίως), του βλαστού, των φύλλων και της ράγας, ενώ η δραστηριότητα της στις ράγες, είναι μέγιστη κατά την ωρίμανση.

Τα νιτρώδη ιόντα είναι τοξικά και δεν αποθηκεύονται, ανάγονται σε αμμωνιακά ιόντα στους χλωροπλάστες των φύλλων και στα πλαστίδια των ριζών μέσω αντίδρασης η οποία καταλύεται από τη νιτρώδη αναγωγάση.

Τα φυτικά κύτταρα αποφεύγουν την τοξικότητα του αμμωνίου μετατρέποντας το γρήγορα το αμμώνιο σε αμινοξέα. Η μετατροπή αυτή περιλαμβάνει τις διαδοχικές δράσεις της γλουταμινικής συνθετάσης και της γλουταμικής συνθάσης. Η συνθετάση της γλουταμίνης ή γλουταμινική συνθετάση καταλύει την αντίδραση του αμμωνίου με το γλουταμικό, οπότε παράγεται γλουταμίνη.

Η γλουταμική αφυδρογονάση καταλύει μία αμφίδρομη αντίδραση που συνθέτει ή απαμινώνει το γλουταμικό. Μετά την ενσωμάτωσή του σε γλουταμίνη και σε γλουταμικό, το άζωτο ενσωματώνεται σε άλλα αμινοξέα μέσω των αντιδράσεων τρανσαμίνωσης που παίζουν καταλυτικό ρόλο στο μεταβολισμό των αμινοξέων. Τα ένζυμα που λειτουργούν ως καταλύτες σε αυτές τις αντιδράσεις είναι γνωστά ως αμινοτρανσφεράσες, ή τρανσαμινάσες. Έχουν απομονωθεί 80 ένζυμα από φυτικούς ιστούς τα οποία καταλύουν τις αντιδράσεις τρανσαμίνωσης όλων των πρωτεϊνικών αμινοξέων, εκτός από την προλίνη (που στην πραγματικότητα είναι ημινοξύ και όχι αμινοξύ).

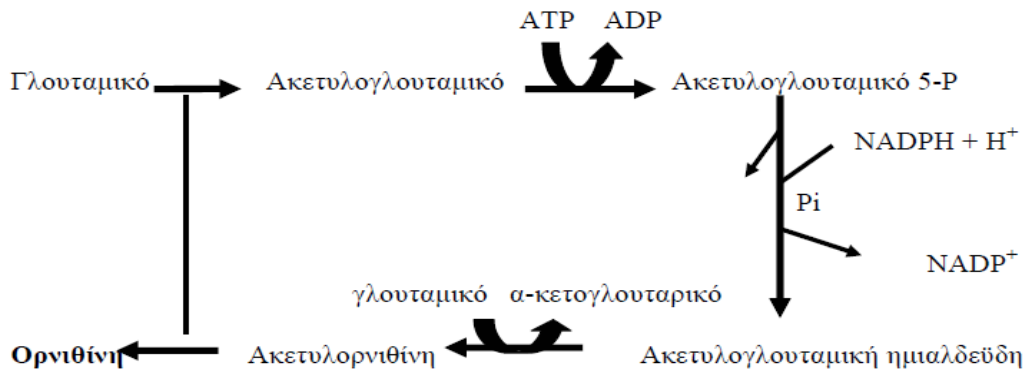
Οι οργανικές ουσίες του εδάφους που περιέχουν άζωτο δεν είναι άμεσα διαθέσιμες από τα πρέμνα. Η ανοργανοποίηση του οργανικού αζώτου ολοκληρώνεται σε τρία στάδια που περιλαμβάνουν την αμινοποίηση(παραγωγή αμινοξέων από την υδρόλυση πρωτεϊνών) από ετερότροφους μικροοργανισμούς του εδάφους, την αμμωνιοποίηση , δηλαδή τη παραγωγή αμμωνίου από την υδρόλυση των αμινοξέων και τέλος τη νιτροποίηση η οποία ολοκληρώνεται σε δύο στάδια και καταλήγει στη παραγωγή νιτρικών ιόντων.

Η αφομοίωση του αζώτου γίνεται στη ρίζα αλλά και στα φύλλα. Στα αγγεία του ξύλου το άζωτο κυκλοφορεί σε νιτρική, αμμωνιακή και οργανική μορφή ενώ στα αγγεία του φλοιώματος κυκλοφορεί μόνο οργανικό N. Τη μεγαλύτερη ανάγκη σε άζωτο εμφανίζουν τα πρέμνα, από τη περίοδο έναρξης της βλάστησης ,όπου χρησιμοποιείται κυρίως το αποθηκευμένο άζωτο από τα πολυετή όργανα μέχρι την άνθιση, όπου διακρίνεται έντονη πρόσληψη από τις ρίζες και μεταφορά στα φωτοσυνθετικά φύλλα. Κατά την έναρξη της καρπόδεσης μέχρι την ωρίμανση το άζωτο συσσωρεύεται στις ράγες, ενώ μετά τον τρυγητό ως τη φυλλόπτωση, παρατηρείται μεταφορά στα πολυετή μέρη του πρέμνου. Η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του αζώτου στα φύλλα και του καθαρού ρυθμού φωτοσύνθεσης είναι ισχυρή (Evans 1989), καθότι το άζωτο συμμετέχει στο μόριο της χλωροφύλλης, ενώ εντοπίζεται στη Rubisco, το βασικότερο ένζυμο του κύκλου του Calvin.

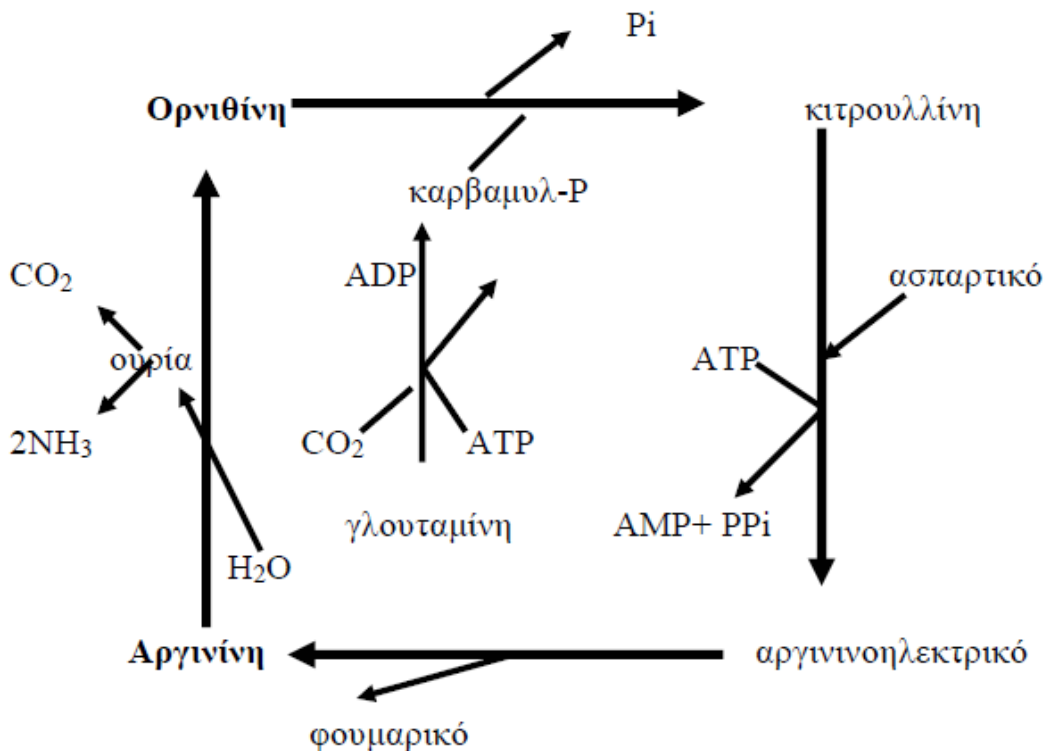
Από τα αμινοξέα στην άμπελο η αργινίνη και η προλίνη, έχουν τον κύριο αποταμιευτικό ρόλο, καθώς και τα δύο χρησιμοποιούνται ως δείκτες του επιπέδου του αζώτου στην άμπελο. Μεταξύ των ελεύθερων αμινοξέων, η προλίνη και η αργινίνη κυριαρχούν στο χυμό των ραγών και αποτελούν το 60-70% των αμινοξέων των ώριμων ραγών (Mullins M.G. et al., 1992). Το οργανικό άζωτο (αμινοξέα, ολιγοπεπτίδια, πολυπεπτίδια και πρωτεΐνες) αυξάνει αρκετά κατά την ωρίμανση, καθώς τα ελεύθερα αμινοξέα (32) στην πλήρη ωρίμανση στα 1-4 g/L αντιπροσωπεύουν το 40% του ολικού αζώτου, με επικρατέστερα την αργινίνη και την προλίνη.

1.5.1 Βιοσύνθεση αργινίνης και προλίνης

Τα αμινοξέα αυτά προέρχονται από το γλουταμικό (εικόνα 1). Το γλουταμικό μεταβολίζεται πρώτα μέσω μιας σειράς αντιδράσεων με ακετυλιωμένα ενδιάμεσα προϊόντα σε ορνιθίνη. Η ορνιθίνη στη συνέχεια μεταβολίζεται σε αργινίνη μέσω του κύκλου της ορνιθίνης.

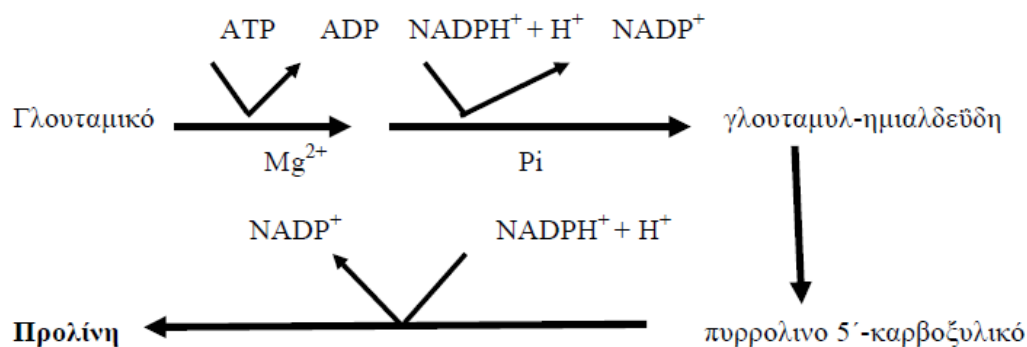


εικ.9 Μεταβολισμός γλουταμικού προς ορνιθίνη (Μελετίου, 2008)



εικ.10 βιοσύνθεση αργινίνης (Μελετίου, 2008)

Κατά τη βιοσύνθεση της προλίνης, το γλουταμικό μεταβολίζεται σε δύο στάδια προς ημιαλδεΐδη ενώ στη συνέχεια παράγεται ένα κυκλικό ενδιάμεσο προϊόν που ανάγεται για να δώσει την προλίνη. Η βιοσύνθεση πραγματοποιείται στο θεμελιώδες κυτόπλασμα. Ο μηχανισμός ρύθμισης της πορείας παραγωγής της προλίνης δεν είναι γνωστός. Εκείνο το οποίο έχει παρατηρηθεί είναι ότι η συκέντρωση της προλίνης αυξάνει σημαντικά, σε αρκετές περιπτώσεις, κάτω από συνθήκες καταπόνησης (αλατότητα, ξηρασία, θερμοκρασία) μεταβολισμός φυτών, ενώ παράλληλα μπορεί να έχει προστατευτικό ρόλο σε πρέμνα με οξειδωτική καταπόνηση (M. Ozden 2009).



εικ.11 βιοσύνθεση προλίνης (Μελετίου, 2008)

Σε αρκετές μελέτες αναφέρεται η συσσώρευση της προλίνης σε ιστούς που υφίστανται υδατική καταπόνηση, ενώ η Η προλίνη συντελεί στην αποφυγή του υδατικού stress, μέσω ρύθμισης της ωσμωτικής πίεσης. Η προλίνη δρώντας ως ωσμωλίτης, συγκεντρώνεται στο ακρόρριζο, σε συνθήκες υδατικής έλλειψης προκειμένου να ελαττωθεί το υδατικό δυναμικό στη περιοχή της ρίζας (Ψ) αφού παράλληλα ελαττώνεται και το ωσμωτικό δυναμικό (Ψ_s) και διατηρείται η σπαργή των κυττάρων. Η συσσώρευσή της παρ' όλα αυτά κατά την ωρίμανση των ραγών φαίνεται ότι δεν επηρεάζεται από πιθανή υδατική στέρση και αποτελεί προγραμματισμένο μηχανισμό για την ομαλή ανάπτυξη των ραγών. (Stines et al., 2000).

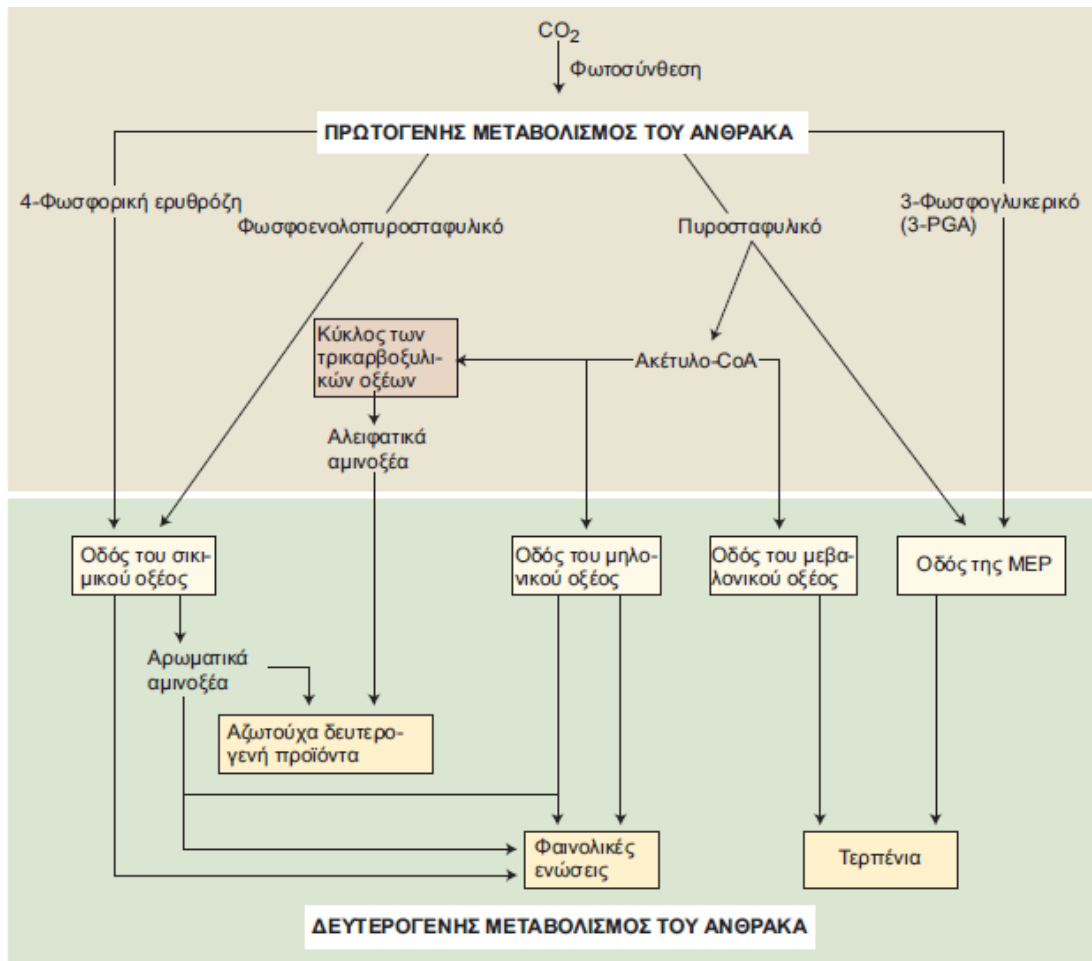
1.5.2 Ο ρόλος των αμινοξέων στο γλέυκος και στον οίνο

Τα αζωτούχα συστατικά του γλεύκους είναι μετά τα σάκχαρα οι επόμενοι σημαντικοί μεταβολίτες των ζυμών. Το περιεχόμενο του γλεύκους σε άζωτο ποικίλει από 60-2400 mg N/L ,και αποτελεί ιδιαίτερα σημαντικό παράγοντα για την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων, την εξέλιξη και τη ταχύτητα της αλκοολικής ζύμωσης. Η αργινίνη(1,6g/L) και η προλίνη(2g/L) είναι τα κύρια αμινοξέα του γλεύκους (Stines et al., 2000), ενώ ακολουθούν η αλανίνη το ασπαρτικό και το γλουταμινικό οξύ. Τα

αμμωνιακά ιόντα καθώς και τα αμινοξέα του γλεύκους , εκτός από τη προλίνη η οποία δεν χρησιμοποιείται σε αναερόβιες συνθήκες,μπορούν να αφομοιωθούν εύκολα ως πηγές αζώτου κατά την αλκοολική ζύμωση. Γλεύκη με χαμηλή περιεκτικότητα σε αφομοιώσιμο άζωτο αλλά με υψηλή συγκέντρωση προλίνης οδήγησαν σε αργές, ακόμα και σε κολλημένες ζυμώσεις. (Stines et al., 2000,)

1.6 Φαινολικές ενώσεις

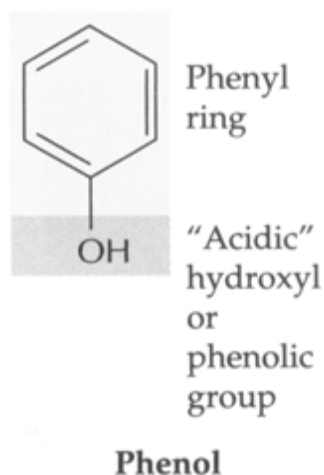
Οι φαινολικές ενώσεις ανήκουν στους δευτερογενείς μεταβολίτες του φυτού ,είναι δηλαδή φυσικά προϊόντα που το προστατεύουν από τα φυτοφάγα ζώα, τους μικροοργανισμούς καθώς και από διάφορους παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης.



Εικ. 12 οι κυριότερες οδοί βιοσύνθεσης των δευτερογενών μεταβολιτών και η σύνδεσή τους με τον πρωτογενή μεταβολισμό

Οι φαινολικές ενώσεις είναι αρωματικοί μεταβολίτες και αποτελούν μια ποικιλία από χημικά ετερογενή δευτερογενή προϊόντα που περιέχουν τουλάχιστον μια φαινολική ομάδα (Εικόνα 13). Οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις στη ράγα προέρχονται κυρίως από φαινυλοπροπάνοειδή ή οξικά φαινυλοπροπανοειδή. Οι φαινυλοπροπανοειδείς ενώσεις, παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση, ανάπτυξη αναπαραγωγή και φυσιολογία του πρέμνου Τα φαινολικά συστατικά του σταφυλιού εντοπίζονται κυρίως στα γίγαρτα και στον φλοιό και συνεισφέρουν στη ποιότητα και στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του παραγόμενου οίνου. Διακρίνουμε δύο μεγάλες ομάδες φαινολικών στον οίνο, τις μη φλαβονοειδείς

φαινόλες(υδροξυβενζοϊκά και υδροξυκιναμμωμικά οξέα και τα παράγωγά τους στυλβένια και φαινολικές αλκοόλες. (Monagas et al.,2006) και τις φλαβονοειδείς φαινόλες(ανθοκυάνες, φλαβαν-3-όλες, φλαβονόλες).

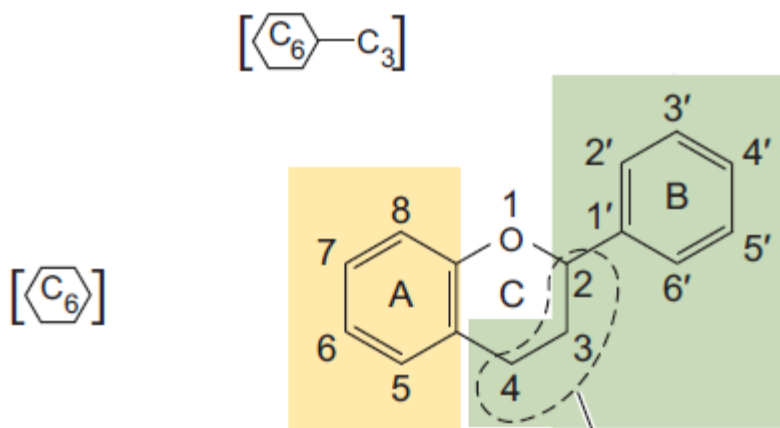


Εικ.13 Χημική δομή της φαινόλης (Μελετίου, 2008)

1.6.1 Φλαβονοειδή

Είναι προϊόντα μεταβολισμού των οξικών φαινυλοπροπανοειδών και αποτελούν μια τεράστια ομάδα χημικών ενώσεων (περίπου 4.500).Ο βασικός σκελετός αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα που συνθέτουν δύο αρωματικούς δακτυλίους(A και B) οι οποίοι ενώνονται σε έναν ετεροκυκλικό C δακτύλιο από 3 άτομα άνθρακα. (Garrido et al. 2013) Οι διάφορες κατηγορίες προκύπτουν από το βαθμό οξείδωσης του C δακτυλίου και περιλαμβάνουν τις φλαβονόλες τις ανθοκυάνες και τις φλαβαν-3-όλες, οι οποίες μπορεί να δεχτούν άλλες μετατροπές(μεθυλιώσεις, υδροξυλιώσεις, γλυκοζυλιώσεις) που να οδηγήσουν στο σχηματισμό διαφορετικών μορίων. Η

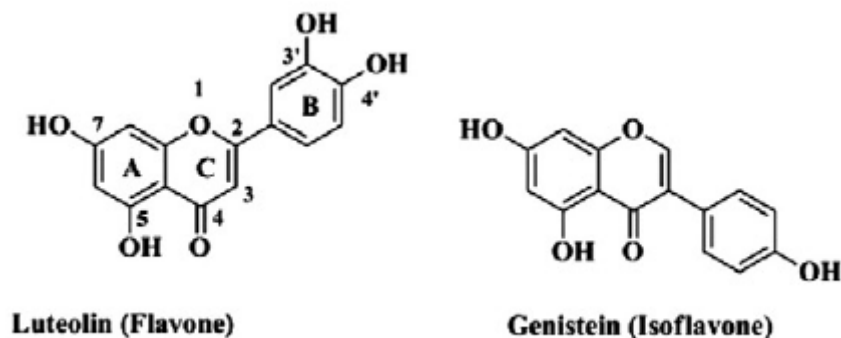
συμπύκνωση των φλαβαν-3-όλων οδηγεί στο σχηματισμό των προανθοκυανιδινών η συμπυκνωμένων ταννινών (Roussel et al. 2007). Η μεγαλύτερη συγκέντρωση των φλαβονοειδών εντοπίζεται στην άνθιση ακολουθώντας μία πτωτική πορεία καθώς αυξάνεται το μέγεθος της ράγας.



Εικ.14 Χημική δομή φλαβονοειδούς (Taiz L, Zeiger E. 2012.)

1.6.1.1 Φλαβόνες-ισοφλαβόνες

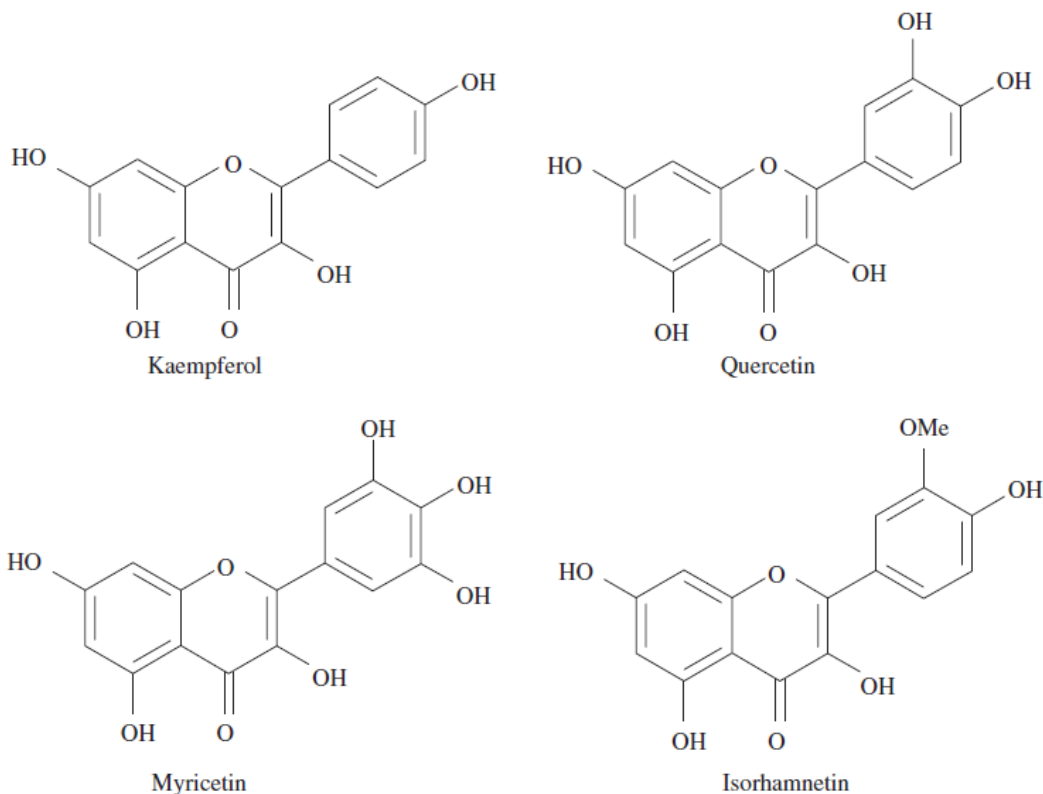
Οι φλαβόνες χαρακτηρίζονται από τη παρουσία ενός διπλού δεσμού ανάμεσα στα C2 και C3 άτομα άνθρακα και την απουσία υδροξυλικής ομάδας από τον άνθρακα στη θέση 3. Στο σταφύλι βρίσκονται σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις εκτός από τη λουτεολίνη η οποία έχει προσδιοριστεί σε μεγαλύτερα ποσοστά σε ράγες (Fang et al. 2008). Ισοφλαβόνες είναι ισομερή των φλαβονών στη θέση 3 του αρωματικού δακτυλίου B. Η γενιστεΐνη αποτελεί ισοφλαβόνη η οποία έχει προσδιοριστεί σε ράγες και σε οίνο.



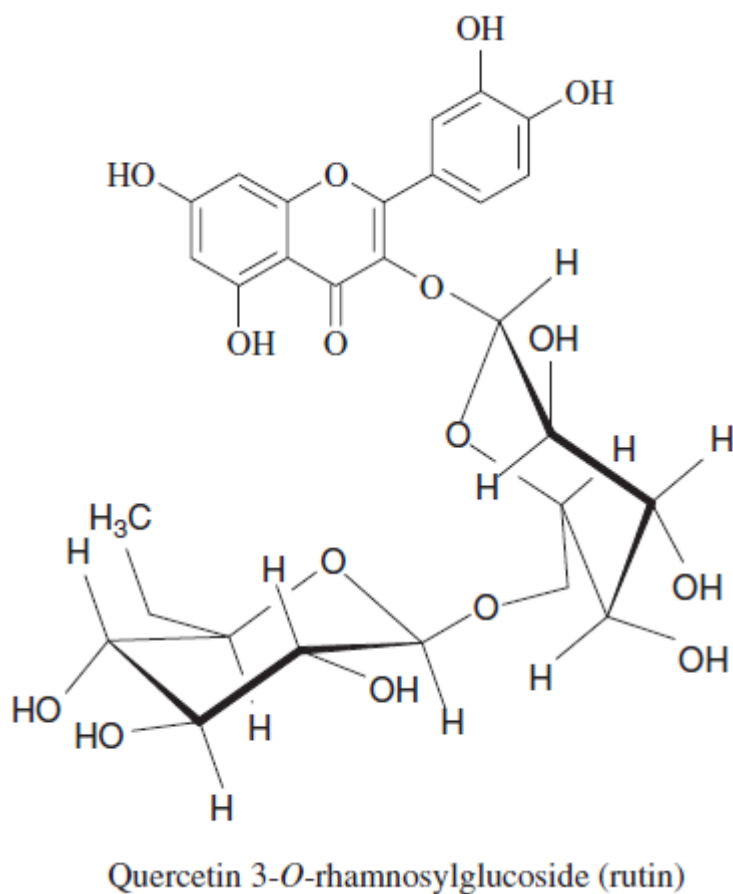
Εικ.15 Χημική δομή φλαβόνης και ισοφλαβόνης (Garrido et al. 2013)

1.6.1.2 Φλαβονόλες.

Οι φλαβονόλες χαρακτηρίζονται από τη παρουσία ενός διπλού δεσμού ανάμεσα στα C2 και C3 άτομα και μίας υδροξυλικής ομάδας στη θέση 3. Στο σταφύλι εντοπίζονται σε σημαντικές ποσότητες η κερκετίνη η καμπεφερόλη και η μυρκετίνη, ενώ στο φλοιό της ποικιλίας *peti verdot* έχει αναφερθεί η παρουσία της ρουτίνης η οποία προκύπτει από ένωση της κερκετίνης με τον δισακχαρίτη ρουτινόζη (Garrido et al. 2013). Στη ράγα οι ενώσεις αυτές απαντώνται και με την γλυκοζυλιωμένη τους μορφή, κατά την οποία το μόριο της φαινόλης είναι ενωμένο με ένα μόριο μονοσακχαρίτη (γλυκόζη, γαλακτόζη, γλυκουρονικό οξύ) ή δισακχαρίτη στη θέση 3 του κεντρικού δακτυλίου (Makris et al. 2006). Ποικιλίες αμπέλου με χονδρό φλοιό ή μικρόρραγες (μεγάλο ποσοστό φλοιών έναντι σάρκας), περιέχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση φλαβονολών που συμβάλλουν στην σταθερότητα του χρώματος του παραγόμενου οίνου (Braidot et al. 2008). Στο λευκό οίνο μόνο η καμπεφερόλη, η κερκετίνη και η ισοραμνετίνη έχουν εντοπιστεί καθώς απουσιάζει το ένζυμο 3,5 υδροξυλάση των φλαβονοϊδων που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση των υπολοίπων όπως η μυρκετίνη. (Jeffery et al. 2008, Mattivi et al. 2006). Οι φλαβονόλες δρουν προστατεύοντας το σταφύλι από τη UV ατινοβολία και τις ελεύθερες ρίζες (Downey et al. 2003). Δύο είναι οι περίοδοι βιοσύνθεσης για τις φλαβονόλες, μία στην άνθιση και μία δύο εβδομάδες μετά τον περκασμό, βέβαια μεγαλύτερο ποσοστό παρουσιάζεται στα αρχικά στάδια ανάπτυξης της ράγας (Downey et al. 2006).



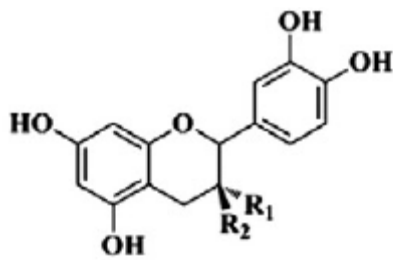
Εικ.16 Χημική δομή 4 βασικών φλαβονολών (Makris et al. 2006)



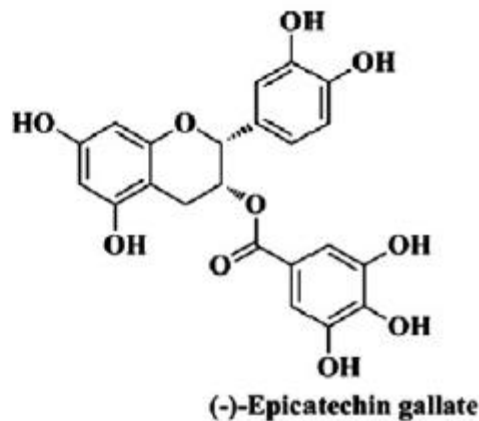
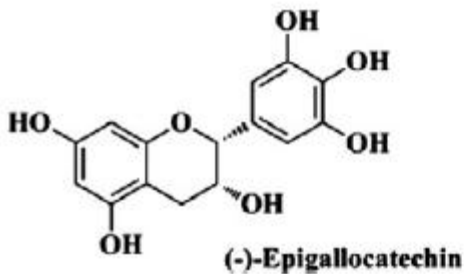
Εικ.17 Χημική δομή γλυκοζυλιωμένης φλαβονόλης (Makris et al. 2006)

1.6.1.3 Φλαβανόλες

Οι φλαβανόλες διακρίνονται στις φλαβαν-3-όλες και στις φλαβαν-3,4-διόλες, με τις δεύτερες να εντοπίζονται κυρίως στο ξύλο και σπανία στις ράγες. Οι φλαβαν-3,4-διόλες συχνά αναφέρονται και ως λευκοανθοκυανιδίνες. Στη φύση οι πιο συχνές φλαβαν-3-όλες είναι η κατεχίνη και η επικατεχίνη οι οποίες ανιχνεύονται τόσο στα γίγαρτα όσο και στο φλοιό των ραγών. Στον λευκό οίνο η κατεχίνη αποτελεί το πιο σημαντικό φλαβονοειδές το οποίο συνεισφέρει στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του (Jeffery et al. 2008, Mattivi et al. 2006, Braidot et al. 2008).



$R_1=OH; R_2=H$ Κατεχίνη
 $R_1=H; R_2=OH$ Επικατεχίνη



Εικ.18 Χημική δομή μονομερών φλαβανολών

1.6.1.4 Ταννίνες

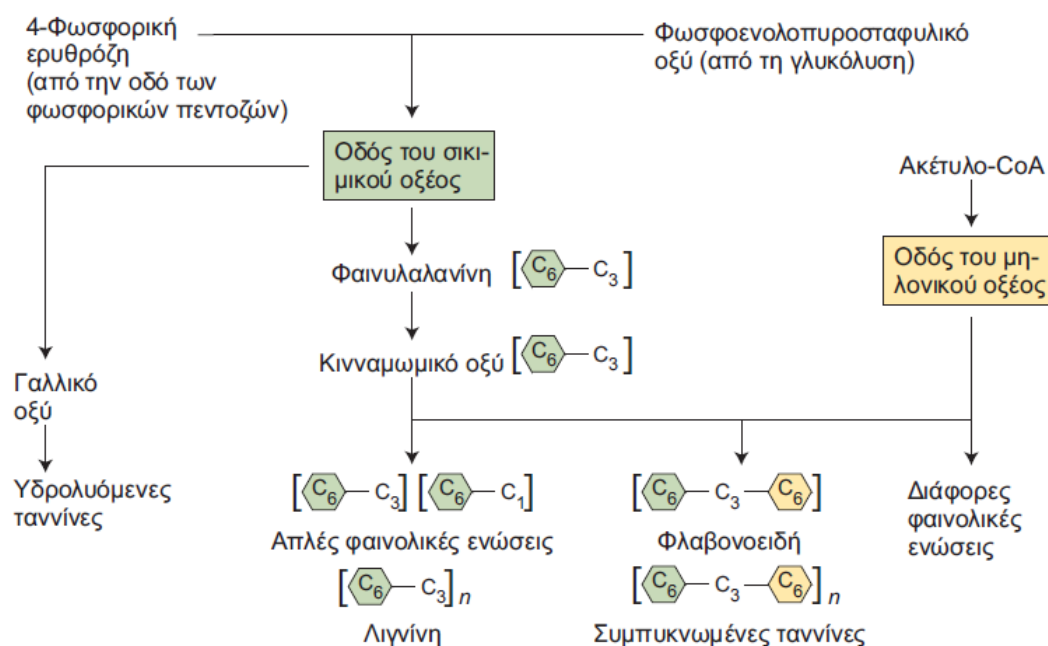
Οι ταννίνες ή προανθοκυανιδίνες στο σταφύλι βρίσκονται στα γίγαρτα και στους φλοιούς καθορίζοντας την αίσθηση του πικρού και του συφού και συνεισφέροντας στη σταθερότητα του χρώματος του παραγόμενου οίνου μέσω συμπλεγμάτων με τις ανθοκυάνες. Ο ρόλος τους στη ράγα δεν είναι πλήρως κατανοητός αλλά πιθανότατα λόγω της πικρής και συφής γεύσης τους να αποτελούν αμυντικό μηχανισμό για το πρέμνο απέναντι στα φυτοφάγα ζώα και στα έντομα (Malien-Aubert et al. 2002, Mateus et al. 2002,). Ο όρος ταννίνη στον οίνο αναφέρεται σε μια ποικιλία πολυφαινολικών ολιγομερών και πολυμερών που αποτελούνται από μονομερή φλαβαν-3-όλων όπως η κατεχίνη και η επικατεχίνη (Harbertson et al. 2002). Βιοσύνθεση των ταννινών ακολουθεί ένα μονοπάτι που περιλαμβάνει αυτή των ανθοκυανών και φλαβονολών. Παρά το μεγάλο ενδιαφέρον που παρουσιάζουν οι ταννίνες τόσο για το αμπέλι όσο και για το κρασί η οδός βιοσύνθεσής τους, δεν έχει μελετηθεί πλήρως. Η συσσώρευση ταννινών στους φλοιούς ξεκινά μία με δύο εβδομάδες πριν τον περκασμό και παρουσιάζεται μέγιστη στο περκασμό, απ' όπου ακολούθως μειώνεται μέχρι την ωρίμανση. Στα γίγαρτα η περιεκτικότητα σε ταννίνες μεγιστοποιείται πριν το περκασμό και όμοια με τους φλοιούς μειώνεται ως την ωρίμανση. (Downey et al, 2003). Οι ταννίνες των γιγάρτων είναι πολυμερή που αποτελούνται από μονομερή κατεχίνης επικατεχίνης και γαλλικού εστέρα της επικατεχίνης ενώ οι ταννίνες των φλοιών συνίστανται κυρίως από επικατεχίνη και

επιγαλοκατεχίνη braidot, (Braidot et al. 2008, Downey et al, 2003).). Συνολικά τα γίγαρτα συγκεντρώνουν μεγαλύτερο ποσοστό ταννινών αλλά με μικρότερο βαθμό πολυμερισμού (mDP~5) σε σχέση με τους φλοιούς (mDP~40). Στους νέους οίνους παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωση διμερών και τριμερών η οποία πέφτει κατά την οξειδωτική παλαίωση (Cheynier et al. 2006, Kennedy et al. 2001).

1.6.2 Βιοσύνθεση φλαβονοειδών

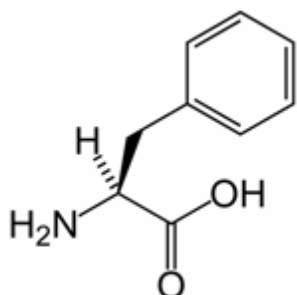
Τα φλαβονοειδή περιλαμβάνουν διαφόρων ειδών ενώσεις που έχουν μια μεγάλη ποικιλία λειτουργιών. Πολλές από τις αλληλεπιδράσεις φυτών-ζώων επηρεάζονται από τα φλαβονοειδή. Η Βιοσύνθεση των φλαβονοειδών έχει πολλά σημεία διακλάδωσης γιατί σ'αυτά ανήκουν διαφορετικές κατηγορίες ενώσεων που περιλαμβάνουν τις χαλκόνες, φλαβονόνες, ισοφλαβονοειδή, φλαβόνες, φλαβονόλες, κατεχίνες, ανθοκυανίνες.

Δύο είναι οι κύριες οδοί σύνθεσης των φαινολικών ενώσεων. Στα ανώτερα φυτά όπως και στο αμπέλι οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις προέρχονται τουλάχιστον εν μέρει από τη φαινυλαλανίνη, ένα προϊόν της οδού του σικιμικού οξέος



Εικ.20 οδοί σύνθεσης των φαινολικών ενώσεων (Taiz L, Zeiger E. 2012. Φυσιολογία Φυτών)

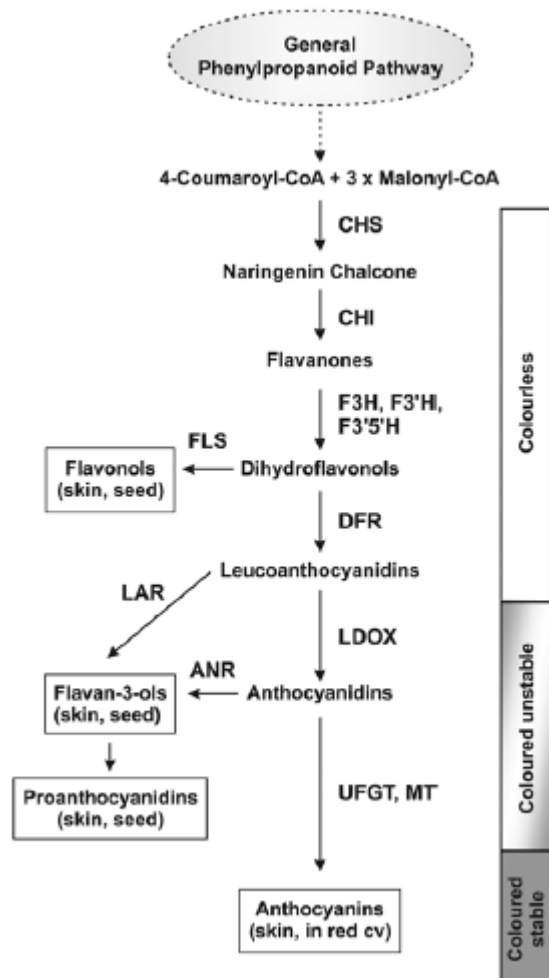
Όλα τα φαινυλοπροπανοειδή προέρχονται από την φαινυλαλανίνη (Phe) Ένα μοναδικό ένζυμο οδηγεί την μετατροπή του άνθρακα από τα αρωματικά αμινοξέα στη σύνθεση των φαινυλοπροπανοειδών, η αμμωνιακή λειάση της φαινυλαλανίνης (PAL).



Εικ.20 Χημική δομή φαινυλαλανίνης (Μελετίου, 2008)

Η PAL σπάνια κωδικοποιείται από ένα γονίδιο. Στις περισσότερες περιπτώσεις αποτελεί προϊόν μιας πολυγονιδιακής οικογένειας. Η PAL είναι το πλέον μελετημένο ένζυμο του δευτερογενούς μεταβολισμού, καθώς βρίσκεται σε ένα σημείο διακλάδωσης μεταξύ πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού, ώστε η αντίδραση που καταλύει αποτελεί σημαντικό ρυθμιστικό στάδιο για το σχηματισμό πολλών φαινολικών ενώσεων. Αύξηση της ενεργότητας της PAL έχει συνδεθεί με την επίδραση διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων ή και παραγόντων καταπόνησης (Rusjan et al. 2012, Archana et al. 2011) καθώς και με την αντιμετώπιση στα παθογόνα.

Το πρώτο στάδιο που οδηγεί αποκλειστικώς στη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών είναι αυτό που καταλύεται από τη συνθάση της χαλκόνης (CHS). Η χαλκόνη είναι προϊόν της σύντηξης τριών μορίων μαλονυλο-CoA και ενός μορίου p-κουμαρυλο-CoA (Εικόνα 21.). Από τη χαλκόνη προκύπτουν οι φλαβανόνες οι οποίες με τη δράση του ενζύμου F3H οδηγούνται στη σύνθεση των διυδροφλαβανολών οι οποίες αποτελούν υπόστρωμα για την διυδροφλαβανόλ- 4- αναγωγή (DFR), ένα ιδιαίτερα σημαντικό ένζυμο για τη σύνθεση των φλαβονολών των ανθοκυανών και των προανθοκυανιδινών (Gutha et al 2010, Zouid I. 2011)



Εικ. 21 Περιληπτικό σχήμα της βιοσύνθεσης των φαινολικών ενώσεων (Braidot et al. 2008)

1.6.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την βιοσύνθεση των φαινολικών ενώσεων

Η βιοσύνθεση των φλαβονοιδών στην άμπελο επηρεάζεται από γενετικούς, περιβαλλοντικούς παράγοντες καθώς και από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Σύμφωνα με τον Downey et al. 2006, σε συνθήκες αυξημένης λίπανσης αζώτου μειώνεται η βιοσύνθεση των ταννινών λόγω αυξημένης βλαστικής ανάπτυξης. Το έδαφος του αμπελώνα και κυρίως η ικανότητα συγκράτησης νερού φαίνεται να επιδρά στη βιοσύνθεση των φαινολικών. Το σύστημα άρδευσης και η επιλογή ήπιου υδατικού στρες επηρεάζει την ανάπτυξη της ράγας και τη βιοσύνθεση των φαινολικών. Το ήπιο υδατικό έλλειμμα πριν ή μετά τον περκασμό φαίνεται από έρευνες Kennedy et al. 2002 και Roby et al. 2004, ότι επηρεάζει τη βιοσύνθεση των ταννινών, έμμεσα καθότι η περιεκτικότητα στους φλοιούς αυξάνεται λόγω μείωσης του μεγέθους της ράγας και αύξησης του λόγου φλοιός προς σάρκα. Η ηλικιακή ακτινοβολία επιδρά εξίσου στη βιοσύνθεση ολικών φαινολικών και των

ταννινών ,αφού όπως έδειξαν οι Downey et al, 2004, η πειραματική σκίαση κατά την ανάπτυξη των σταφυλών παρουσίασε χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ταννίνες κατά την ανάπτυξη των ραγών και χαμηλότερα ποσοστά ολικών φαινολικών στο παραγόμενο οίνο (Ristic et al 2007). Η συσώρευση των γλυκοζυλιωμένων φλαβονολών παρατηρήθηκε αυξημένη από τους (Sprayd et al. 2002) σε ράγες εκτεθειμένες σε ηλιακό φως σε σύγκριση με αυτές υπό σκίαση, ενώ φαίνεται ότι εκφράζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο συνθάση των φλαβονολών (FLS)(Downey et al, 2005).

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Ποικιλίες

Μελετήθηκαν δύο ποικιλίες το Ασύρτικο και το Αηδάνι. Η έναρξη βλάστησης στη Σαντορίνη για το Ασύρτικο τοποθετείται στα μέσα του Μαρτίου και ολοκληρώνεται το 2^ο δεκαήμερο του Απριλίου. Αντίστοιχα η άνθηση τοποθετείται 5-10 Μαΐου, η έναρξη της ωρίμανσης αρχές Ιουλίου και η πλήρης ωρίμανση τέλος Ιουλίου με αρχές Αυγούστου. Αντίθετα για το Αηδάνι η έναρξη βλάστησης και η ωρίμανση τοποθετούνται δεκαπέντε μέρες μετά από το Ασύρτικο.

2.2 Πειραματικός Αμπελώνας

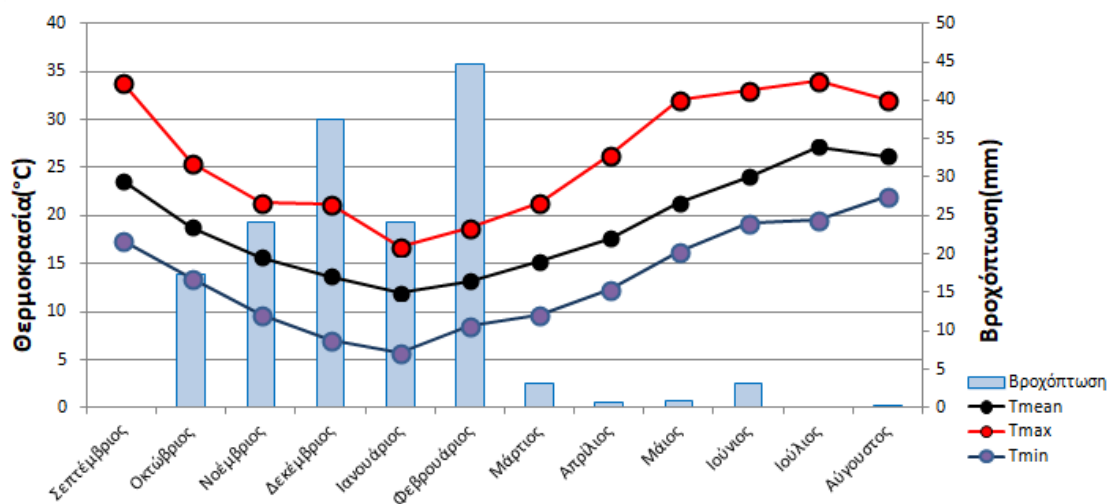
Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στους αμπελώνες του κτήματος Σιγάλα (36°28'55''N, 25° 23' 39'' E) στη περιοχή της Οίας την καλλιεργητική περίοδο 2017-2018. Τα πρέμνα της ποικιλίας Ασύρτικο είναι 4 ετών, αυτόρριζα μορφωμένα σε μονόπλευρο Guyot αρδευόμενα και σε παραδοσιακό ξηρικό διαμορφωμένο σε κουλούρες. Για το Αηδάνι τα πρέμνα είναι αυτόρριζα μορφωμένα σε γραμμικό σύστημα. Ο προσανατολισμός των γραμμών στο γραμμικό σύστημα μόρφωσης είναι Βορράς-Νότος διαμορφωμένο σε σύστημα Guyot με μία αμολυτή με 6-8 οφθαλμούς με αποστάσεις φύτευσης 2x0,9x0,9m, η πυκνότητα φύτευσης είναι 7700φυτά/ha και συνολικής έκτασής 0,3ha. Στα πρέμνα με το παραδοσιακό σύστημα μόρφωσης οι αποστάσεις φύτευσης είναι κατά μέσο όρο 2x2m, η πυκνότητα φύτευσης ≈2500/ha και συνολική έκταση 0,6ha.



Εικ. 22 Περιοχή πειράματος

2.3 Κλιματολογικές συνθήκες και τρύγος

Με βάση τα στοιχεία του Μ.Σ. Σαντορίνης για το καλλιεργητικό έτος 2017-2018 η ετήσια μέση θερμοκρασία του αέρα κυμαίνεται από 11,9°C – 27,1°C με ψυχρότερο μήνα τον Ιανουάριο και θερμότερους τους μήνες Ιούλιο και Αύγουστο. Η συνολική βροχόπτωση κατανέμεται στη περίοδο Οκτωβρίου- Φεβρουαρίου και ήταν 156 mm (249 mm κατά την αντίστοιχη περσινή περίοδο)



Εικ. 23 Στο ραβδόγραμμα παρουσιάζεται η μέση ετήσια βροχόπτωση για το καλλιεργητικό έτος 2017-2018 ανά μήνα σε συνάρτηση με τη διακύμανση της μέσης (Tmean), ελάχιστης (Tmin) και μέγιστης (Tmax) θερμοκρασίας ατμόσφαιρας ανά μήνα. <http://meteosearch.meteo.gr/stationInfo.asp>

Η άνθιση και η καρπόδεση εξελίχθηκαν πρώιμα σε σχέση με παλαιότερες χρονιές, ενώ οι υψηλές θερμοκρασίες κατά τους καλοκαιρινούς μήνες επιτάχυναν την ωρίμανση και στις 2 ποικιλίες. Συμπερασματικά η έλλειψη βροχοπτώσεων των τελευταίων χρόνων και οι ιδιαίτερα ξηροθερμικές συνθήκες του θέρους οδήγησαν σε μια εξαιρετικά περιορισμένη παραγωγή. Ο τρύγος του 2018 ήταν ο πιο πρώιμος στη Σαντορίνη τα τελευταία 10 χρόνια, καθότι ξεκίνησε δέκα μέρες νωρίτερα σε σύγκριση με τη μέση ημερομηνία έναρξης των τελευταίων χρόνων.

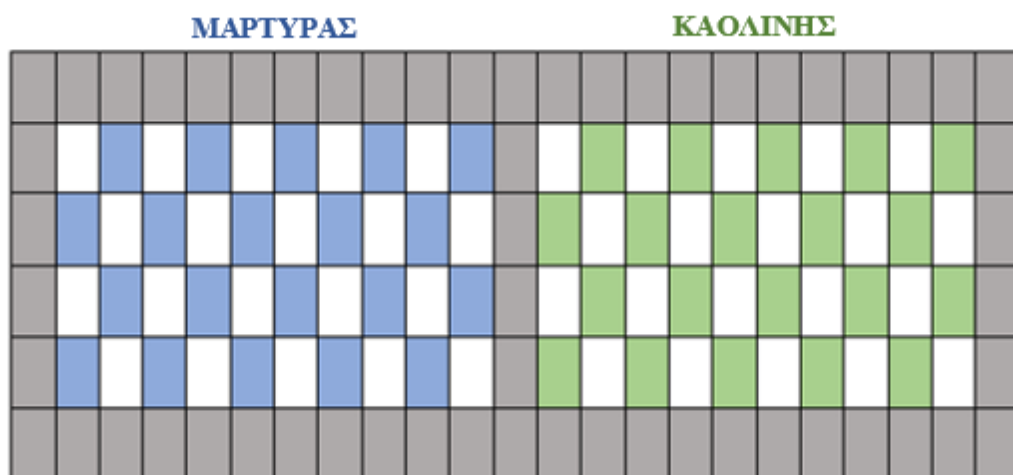
2.4 Σχεδιασμός πειράματος

Το πείραμα αποτελείται από 2 επεμβάσεις, την μεταχείριση του Καολίνη και ένα Μάρτυρα , με 4 επαναλήψεις των 5 πρέμνων. Για την περίπτωση του Καολίνη πραγματοποιήθηκαν 3 ψεκασμοί με τον πρώτο να εφαρμόζεται στο στάδιο της πράσινης ράγας. Σκοπός των ψεκασμών ήταν να παραμείνει η φυλλική επιφάνεια άσπρη σε όλα τα στάδια μέχρι την ωρίμανση. Οι ψεκασμοί πραγματοποιήθηκαν με την χρήση ψεκαστικού, πρωινές ώρες σε συνθήκες άπνοιας. Χρησιμοποιήθηκε η συνιστώμενη δόση Καολίνης 5kg/100L νερού και προσθήκη προσκολλητικού. Το σκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε για την συγκεκριμένη μεταχείριση ήταν το Surround WP CROP PROTECTANT.

Στη περίπτωση του αμπελοτεμαχίου με το γραμμικό σύστημα μόρφωσης (όμοια για Ασύρτικο και Αηδάνι)επιλέχθηκαν 20 πρέμνα ανά επέμβαση (εικ. 24), με γαλάζιο χρώμα η επέμβαση του καολίνη με πράσινο ο μάρτυρας, ενώ με γκρι γραμμές τα όρια μεταξύ τους. Όμοια μεταχείριση πραγματοποιήθηκε και για το αμπελοτεμάχιο με το παραδοσιακό σύστημα μόρφωσης(εικ .25).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
ΜΑΡΤΥΡΑΣ ΚΑΟΛΙΝΗ																					

Εικ.24 Πειραματικός σχεδιασμός αμπελοτεμαχίου με γραμμικό σύστημα μόρφωσης (μονόπλευρο Guyot)



Εικ.25 Πειραματικός σχεδιασμός αμπελοτεμαχίου μορφωμένο σε Κουλούρα

2.5 Δειγματοληψία και χειρισμός ραγών

Η δειγματοληψία αντιπροσωπευτικού δείγματος σταφυλών και ραγών πραγματοποιήθηκε κατά την τεχνολογική ωρίμαση των σταφυλιών. Συνολικά έγιναν 6 δειγματοληψίες(επεμβάσεις),2 για το Αηδάνι (μάρτυρας και καολίνης) 4 για τη ποικιλία Ασύρτικο(μάρτυρας και καολίνης) 2 για το αμπελοτεμάχιο με το γραμμικό σύστημα μόρφωσης και 2 για το αμπελοτεμάχιο με το παραδοσιακό αντίστοιχα. Σε κάθε δειγματοληψία ληφθήκαν 5 σταφυλές από κύριους βλαστούς που βρίσκονταν σε διαφορετικές θέσεις (σκιασμένες ή μη σκιασμένες) και από διαφορετικές θέσεις επί των βλαστών (κορυφή, μέση, βάση).

Ακολούθησαν οι μηχανικές αναλύσεις των σταφυλών και των ραγών όπως περιγράφεται παρακάτω και μετρήθηκε η ολική, η ενεργή οξύτητα των γλευκών και η σακχαροπεριεκτικότητά τους. Ακολούθησε διαχωρισμός των ραγών σε φλοιούς, γίγαρτα και σάρκα, για κάθε επανάληψη. Οι φλοιοί και τα γίγαρτα αποξηράθηκαν με την διαδικασία της λυοφυλίωσης και στη συνέχεια κονιορτοποιήθηκαν σε μύλο. Η σάρκα κάθε επανάληψης πολτοποιήθηκε ξεχωριστά. Στη συνέχεια όλα τα δείγματα (φλοιοί, γίγαρτα, γλεύκος) διατηρήθηκαν υπό βαθιά κατάψυξη στους -80 °C.

2.6 Μηχανικές αναλύσεις σταφυλής και ράγας

2.6.1 Βάρος Σταφυλής

Από κάθε επέμβαση ληφθήκαν τυχαία 5 σταφυλές, όπως αναφέρθηκε, και μετρήθηκε το βάρος αυτών με ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας. Στη συνέχεια υπολογίστηκε το μέσο βάρος σταφυλής κάθε επέμβασης.

2.6.2 Μήκος και πλάτος σταφυλής

Για κάθε επέμβαση μετρήθηκε το μήκος και πλάτος των σταφυλών με ακρίβεια χιλιοστού του μέτρου και εξήχθη το μέσο μήκος και πλάτος σταφυλής κάθε επέμβασης

2.6.3 Μέσο βάρος ράγας

Λήφθηκαν τυχαία 3 ομάδες 50 ραγών από κάθε επέμβαση και μετρήθηκε το βάρος κάθε ομάδας με ζυγό ακρίβειας. Αυτό το βάρος διαιρέθηκε με τον αριθμό των ραγών και έτσι υπολογίστηκε το μέσο βάρος ράγας σε γραμμάρια, για κάθε ομάδα.

2.6.4 Μέσο μήκος και πλάτος ραγών

Από κάθε ομάδα ραγών ληφθήκαν 10 ράγες και μετρήθηκε το μήκος και το πλάτος κάθε ράγας με τη βοήθεια ψηφιακού παχύμετρου και με ακρίβεια δύο δεκαδικών ψηφίων. Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο μέσος όρος του μήκους και του πλάτους ράγας για κάθε ομάδα.

2.6.5 Ποσοστό υγρασίας και ξηράς ουσίας ράγας

Για να υπολογιστεί το ποσοστό υγρασίας και ξηράς ουσίας που περιέχουν οι ράγες, πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις για κάθε επέμβαση όπου συλλέχτηκαν για κάθε επανάληψη 5 ράγες και υπολογίστηκε το βάρος τους με ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στο ξηραντήριο και αφέθηκαν για αφυδάτωση για 5 μέρες. Έπειτα, ζυγίστηκαν πάλι, προσδιορίστηκε η διαφορά του βάρους πριν και μετά την αποξήρανση και υπολογίστηκε το ποσοστό υγρασίας ραγών κάθε επέμβασης.

2.7 Μετρήσεις γλευκογραφικών χαρακτηριστικών

2.7.1 Μέτρηση σακχαροπεριεκτικότητας (°Brix)

Ο δείκτης διάθλασης του γλεύκους μετριέται με την βοήθεια διαθλασιμέτρου και εάν η θερμοκρασία μέτρησης είναι διαφορετική των 20 °C η τιμή διορθώνεται μέσω πίνακα. Αρχικά, το διαθλασίμετρο μηδενίζεται. Το μηδέν του οργάνου ρυθμίζεται με απεσταγμένο νερό και το όριο του διαχωρισμού των δύο ζωνών διαφορετικής φωτεινότητας, πρέπει να βρίσκεται στο μηδέν της κλίμακας. Στη συνέχεια τοποθετούνται δύο σταγόνες του προς εξέταση γλεύκους στην επιφάνεια του σταθερού πρίσματος, κατεβαίνει το κινητό πρίσμα και κατευθύνεται το όργανο προς μια πηγή φωτός. Επί της εν λόγω κλίμακας διακρίνεται μια διαχωριστική γραμμή μεταξύ μίας φωτεινής και μιας σκοτεινής ζώνης. Γίνεται ανάγνωση της ένδειξης εκεί όπου βρίσκεται η διαχωριστική γραμμή. Οι επιφάνειες του πρίσματος, μετά από κάθε μέτρηση, σκουπίζονται με ένα καθαρό πανί.

2.7.2 Μέτρηση ενεργής οξύτητας(pH)

Ως ενεργή οξύτητα ή pH καλείται το σύνολο των ελεύθερων καρβοξυλομάδων που βρίσκονται σε διάσταση και δίνουν H⁺. Σε αντίθεση με την ολική οξύτητα η ενεργή οξύτητα εξαρτάται και από το είδος των οργανικών οξέων π.χ. ο οίνος που περιέχει μια ορισμένη ποσότητα τρυγικού οξέος είναι πιο όξινος από τον οίνο που περιέχει ισόποσο ηλεκτρικό οξύ λόγω του διαφορετικού βαθμού διάστασης των ελεύθερων καρβοξυλομάδων. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, η διακύμανση των τιμών του pH εξαρτάται από τη συγκέντρωση των οργανικών οξέων. Το pH του χυμού και του γλεύκους εξαρτώνται από τη συγκέντρωση του τρυγικού οξέος σε ελεύθερη κατάσταση (είναι το πλέον ισχυρό μεταξύ των οργανικών οξέων της ράγας) και από την παρουσία K⁺, που είναι το κύριο κατιόν του γλεύκους (Σταυρακάκης Μ., Αμπελουργία, 2013).Βαθμονομείται το όργανο (pH-μετρο) με διαλύματα (buffer) γνωστού pH. Στη συνέχεια τοποθετείται το δείγμα, που πρέπει να βρίσκεται σε θερμοκρασία 20 °C, σε ποτήρι ζέσεως κι εμβαπτίζεται το ηλεκτρόδιο. Λαμβάνεται η ένδειξη του οργάνου με δύο δεκαδικά ψηφία.

2.7.3 Μέτρηση ολικής οξύτητας

Αρχή της μεθόδου

Η ολική οξύτητα καθορίζεται από το σύνολο των ελεύθερων καρβοξυλομάδων που βρίσκονται στο γλέυκος και στον οίνο και εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε οργανικά οξέα και ανόργανα ανιόντα και κατιόντα, όχι όμως από το είδος τους. Ο προσδιορισμός βασίζεται στην εξουδετέρωση των όξινων ομάδων του δείγματος με πρότυπο αλκαλικό διάλυμα (NaOH 0,1N), παρουσία ενός δείκτη. Ως δείκτης για τον καθορισμό του σημείου εξουδετέρωσης χρησιμοποιείται η φαινολοφθαλεΐνη, με περιοχή εξουδετέρωσης (pH αλλαγής χρώματος) 8,0-9,8 και το καυνό της βρωμοθυμόλης που έχει περιοχή αλλαγής χρώματος το pH 7

Αντιδραστήρια

- Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) κανονικότητας 0,1N.
- Αλκοολικό διάλυμα φαινολοφθαλεΐνης 10 g/L (1%). Για την παρασκευή του διαλύματος διαλύονται 10 g φαινολοφθαλεΐνη σε 1000 mL αλκοόλη 95% vol.

Διαδικασία μέτρησης

Για τη διαδικασία της ογκομέτρησης αρχικά γεμίζει η προχοΐδα με το διάλυμα NaOH και λαμβάνεται η αρχική ένδειξη. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται κωνική φιάλη των 250 ml, στην οποία προστίθενται 10 mL διαχωρισμένο από τους φλοιούς γλέυκος, 10 mL απεσταγμένου νερού και 4–5 σταγόνες διαλύματος φαινολοφθαλεΐνης. Ακολουθεί η τιτλοδότηση με διαρκή ανάδευση της κωνικής φιάλης μέχρι την εμφάνιση του ρόδινου χρώματος, όπου και λαμβάνεται η τελική ένδειξη από τη προχοΐδα. Σημειώνεται ο όγκος NaOH 0,1 N που καταναλώθηκε για την πλήρη εξουδετέρωση των οξέων του δείγματος.

Έκφραση αποτελεσμάτων

Έστω n τα καταναλωθέντα mL NaOH 0,1 N. Η ολική οξύτητα εκφραζόμενη σε meq/L γλεύκους δίνεται από τον τύπο:

$$A = 10 * n \text{ (meq/L)}$$

Ενώ εκφραζόμενη σε g τρυγικού οξέος/L γλεύκους, δίνεται από τον τύπο:

$$A' = 0,075 * A \text{ (g/L σε τρυγικό οξύ)}$$

2.8 Φασματοφωτομετρική μέτρηση αμινοξέων του γλεύκους

2.8.1 Μέτρηση της αργινίνης στο γλεύκος

Η αργινίνη αποτελεί την κύρια μορφή αποταμίευσης αζώτου, αντιστοιχώντας στο 50-70% του διαλυτού αζώτου και στο 10-50% του ολικού αζώτου σε ρίζες, κορμό και κληματίδες πριν την έκπτυξη των οφθαλμών. Η αργινίνη είναι αυτή που τροφοδοτεί κυρίως το πρέμνο σε άζωτο κατά την βλαστική αύξηση την άνοιξη (Kliewer and Cook, 1971).

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός της αργινίνης στο χυμό των ραγών κατά την πλήρη ωρίμανση παρέχει έναν εύκολο και σχετικά φθινό τρόπο προσδιορισμού των αναγκών των πρέμνων σε άζωτο (Ozturk L., Demir Y., 2002). Ο προσδιορισμός της αργινίνης με την αντίδραση Sakaguchi, όπως αυτή έχει τροποποιηθεί από τους Gilboe και Williams (1956), βασίζεται στη παραδοχή ότι το βασικό αμινοξύ αργινίνη, δίνει ένα κόκκινο-ιώδες παράγωγο όταν αντιδράσει με υποβρωμίδες νάτριο σε αλκαλικό περιβάλλον (αντίδραση Sakaguchi) με μέγιστη απορρόφηση στα 500nm.

Αντιδραστήρια

- Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) 10 % σε υδατικό διάλυμα (100 gr/lit).
- 8-Υδροξυκινολίνη 0,02 %: 0,2 g υδροξυκινολίνη διαλυθήκαν σε 100 ml αιθυλική αλκοόλη 95%.
- Υποβρωμιώδες νάτριο 1 %: Προετοιμάζεται διαλύοντας 1 gr υγρού βρωμίου (ισοδύναμο με 0,34 ml υγρού βρωμίου) σε 100 ml 5 % υδροξείδιο του νατρίου. Το βρώμιο έχει υψηλή τοξικότητα και πτητικότητα, για αυτό πρέπει να χρησιμοποιείται προσιφώνιο καθώς και να προφυλάσσονται τα μάτια και το πρόσωπο κατά την παρασκευή του. Έπειτα το αντιδραστήριο θα πρέπει να φυλαχτεί σε σκοτάδι (καφέ φιάλη) και σε ψυχρό μέρος (ψυγείο). Είναι σταθερό για ένα μήνα.
- Ουρία 40 % σε απεσταγμένο νερό (400 gr/lit).

Προετοιμασία δειγμάτων

Τα γλεύκη αφέθηκαν να ξεπαγώσουν σε λεκάνη με νερό και στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση τους με σκοπό την πλήρη ομογενοποίηση τους. Για κάθε ποικιλία έγινε αραιώση του γλεύκους 1:25 σε νερό καθαρότητας HPLC. Από αυτό το αραιωμένο γλεύκος έγινε ο προσδιορισμός της αργινίνης με βάση το παρακάτω πρωτόκολλο.

Διαδικασία μέτρησης

Για κάθε επέμβαση έγιναν 3 επαναλήψεις του πρωτοκόλλου. Σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν:

- 5 ml αραιωμένου γλεύκους (4,8 ml απιονισμένου νερού και 0,2 ml γλεύκους)
- 1 mL 8-υδροξυκινολίνης 0,02%

- 1 mL NaOH 10%. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύτηκαν καλά και τοποθετήθηκαν για δύο λεπτά σε μπάνιο πάγου
- 0,2 mL NaBr (υποβρωμιώδες νάτριο) 1%. Οι σωλήνες αναδεύτηκαν πάλι, τοποθετήθηκαν ξανά στο μπάνιο του πάγου και πολύ γρήγορα προστέθηκε
- 1 mL ουρίας 40%. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύτηκαν καλά και τοποθετήθηκαν για ένα λεπτό σε μπάνιο πάγου.
- 5 mL απεσταγμένου νερού. Ακολούθησε ανάδευση και παραμονή στο μπάνιο πάγου για πέντε λεπτά.

Σε έναν άλλο δοκιμαστικό σωλήνα αντί για αραιωμένο γλεύκος προστέθηκαν 5mL απεσταγμένου νερού κι ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για μηδενισμό του φωτόμετρου. Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 500 nm για τους 3 σωλήνες (επαναλήψεις), που περιείχαν το δείγμα. Για κάθε επανάληψη έγιναν 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε για όλα τα δείγματα.

Χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη βρέθηκε η περιεκτικότητα του δείγματος σε αργινίνη. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ενώση η αργινίνη σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων.

Υπολογισμός της αργινίνης

Η περιεκτικότητα της αργινίνης υπολογίστηκε με βάση τον παρακάτω τύπο και εκφράζεται σε mg αργινίνης / ml γλεύκους: $(A_{500} - 0,0006) * 0,025 / 0,0132$

2.8.2 Μέτρηση της προλίνης στο γλεύκος

Αρχή της μεθόδου

Η προλίνη είναι το αμινοξύ που βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση σε πολλούς οίνους και γλεύκη. Στο χυμό αρκετών ραγών μάλιστα αντιπροσωπεύει το 80 - 90 % του ολικού αζώτου. Η προλίνη είναι μετά την αργινίνη το δεύτερο αμινοξύ σε συγκέντρωση στα σταφύλια κατά το στάδιο της πλήρους ωρίμανσης. Στην πορεία οινοποίησης η προλίνη δεν μεταβολίζεται από τους ζυμομύκητες σε αναερόβιες συνθήκες συνεπώς δεν θεωρείται αφομοιώσιμη. Η μέθοδος Ough (1969) με αντίδραση με τη νινυδρίνη βασίζεται στο ότι η προλίνη σχηματίζει χαρακτηριστική χρώση (πορτοκαλέρυθρο σύμπλοκο) με την νινυδρίνη έπειτα από θέρμανση, η νινυδρίνη είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που αντιδρά με όλα τα α-αμινοξέα στην περιοχή pH 4-8 και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί φασματοφωτομετρικά με μέγιστη απορρόφηση στα 517 nm.

Αντιδραστήρια

- Μυρμηκικό οξύ
- Διάλυμα νινυδρίνης 3%. Προετοιμάζεται διαλύοντας 3 gr νινυδρίνη σε 97 ml αιθανόλης.
- Διάλυμα ισοπροπανόλης 1:1. Προετοιμάζεται διαλύοντας 100ml ισοπροπανόλης σε 100 ml απιονισμένο νερό.

Προετοιμασία δειγμάτων

Τα γλεύκη αφέθηκαν να ξεπαγώσουν σε λεκάνη με νερό και στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση τους με σκοπό την πλήρη ομογενοποίησή τους. Για κάθε ποικιλία έγινε αραιώση του γλεύκους 1:12,5 σε νερό καθαρότητας HPLC. Από αυτό το αραιωμένο γλεύκος έγινε ο προσδιορισμός της προλίνης με βάση το παρακάτω πρωτόκολλο.

Διαδικασία μέτρησης

Για κάθε επέμβαση έγιναν 3 επαναλήψεις του πρωτοκόλλου. Σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν (γρήγορα):

- 0,5 ml χυμού (αραιωμένου)
- 0,25ml μυρμηκικό οξύ. Οι σωλήνες αναδεύτηκαν και προστέθηκε:
- 1ml διάλυμα νινυδρίνης 3%. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες με το μείγμα θερμαίνονται σε ζέον υδατόλουτρο 920C για 15 λεπτά. Στην συνέχεια οι δοκιμαστικοί σωλήνες ψυχθήκαν σε υδατόλουτρο στους 200C για 5-10 λεπτά
- 5ml διάλυμα ισοπροπανόλης 1:1. Οι σωλήνες αναδεύτηκαν πάλι.

Σε έναν άλλο δοκιμαστικό σωλήνα αντί για αραιωμένο γλεύκος προστέθηκαν 5ml απεσταγμένου νερού κι ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για μηδενισμό του φωτόμετρου.

Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 517 nm για τους 3 σωλήνες (επαναλήψεις), που περιείχαν το δείγμα. Για κάθε επανάληψη παρθήκαν 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε για όλα τα δείγματα.

Χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρέθηκε η περιεκτικότητα του δείγματος σε προλίνη. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση η προλίνη σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων.

Υπολογισμός της προλίνης στο γλεύκος των ραγών

Η περιεκτικότητα της προλίνης υπολογίστηκε με βάση τον παρακάτω τύπο και εκφράζεται σε mg προλίνης / ml γλεύκους: $(A_{517} - 0,0016) * 0,0125 / 0,0102$

2.9 Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών στους φλοιούς στα γίγαρτα και στα γλεύκη με τη μέθοδο της φασματοφωτομετρίας

2.9.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Εκχύλιση φλοιών

Για την εκχύλιση των φλοιών παρασκευάστηκε διάλυμα Ακετόνης, Μεθανόλης, Νερού (σε αναλογία 40:40:19), οξινισμένο με πυκνό διάλυμα HCl 12 M, κατά 1% επί του τελικού όγκου του διαλύματος εκχύλισης. Τα διαλύματα και των τριών ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθαρότητας HPLC.

Στη συνέχεια:

- Ζυγίστηκαν 0,4 g φλοιού από κάθε επανάληψη σε ζυγό ακριβείας και αναμείχθηκαν σε 4 mL διαλύματος (αναλογία 1:10).
- Ανάδευση του διαλύματος σε συσκευή Turrax στις 8.000 στροφές για 10 δευτερόλεπτα.
- Το ομογενοποιημένο διάλυμα εκχυλίστηκε υπό ανάδευση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία 25 °C
- Φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 5000 στροφές
- Λήψη του υπερκείμενου (4mL)
- Επανάληψη της διαδικασίας -2η φορά- για το ίζημα από την αρχή, δηλαδή από την προσθήκη 4 mL διαλύματος εκχύλισης
- Εκ νέου λήψη του υπερκείμενου μετά τη φυγοκέντρηση
- Προσθήκη του υπερκείμενου στο προηγούμενο (4mL+4mL=8mL)
- Επανάληψη της διαδικασίας -3η φορά- για το ίζημα από την αρχή

- Εκ νέου λήψη του υπερκείμενου μετά τη φυγοκέντρηση
- Προσθήκη του υπερκείμενου στο προηγούμενο (8mL+4mL=12mL)
- Απόρριψη του ιζήματος
- Τελικός όγκος εκχυλίσματος 12 mL (αναλογία ξηρού βάρους-εκχυλίσματος 1:30)

Ο σκοπός που η διαδικασία εκχύλισης επαναλαμβάνεται τρεις φορές συνολικά είναι για να εξασφαλίσουμε ότι στο τελικό διάλυμα θα έχει εκχυλιστεί όλη η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων. Για κάθε επανάληψη του κάθε τεμαχίου έγινε ξεχωριστή εκχύλιση. Κατά συνέπεια στο τέλος της διαδικασίας υπήρχαν για κάθε επέμβαση τρία διαφορετικά εκχυλίσματα (επανάληψη).

Εκχύλιση γιγάρτων

Τα γίγαρτα περιέχουν γιγαρτέλαιο το οποίο απορροφά σε μήκος κύματος 280 nm. Στο ίδιο μήκος κύματος απορροφούν και οι μεμονωμένες φαινολικές ενώσεις, με αποτέλεσμα να είναι αδύνατο να διαχωρισθούν ικανοποιητικά οι ενώσεις στο όργανο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Για αυτό το λόγο πριν τη διαδικασία της εκχύλισης των φαινολικών ενώσεων, έγινε αφαίρεση του γιγαρτέλαιου από τα κονιορτοποιημένα γίγαρτα με χρήση διαλύματος εξανίου καθαρότητας HPLC, για κάθε επανάληψη, ακολουθώντας την παρακάτω μέθοδο:

- Ζύγισμα 0,4 g λυοφιλομένων και κονιορτοποιημένων γιγάρτων
- Προσθήκη 2 mL εξανίου και ανάδευση
- Φυγοκέντρηση κι απόρριψη υπερκείμενου

Η διαδικασία επαναλήφθηκε για το ίζημα. Για την εκχύλιση των γιγάρτων παρασκευάστηκε διάλυμα Μεθανόλης-Νερού, αναλογίας 80:19. Το διάλυμα αυτό οξινίστηκε με πυκνό διάλυμα HCl 12M, κατά 1% επί του τελικού όγκου του διαλύματος εκχύλισης. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία εκχύλισης των φαινολικών ενώσεων από το παραπάνω ίζημα, κάθε επανάληψης:

- Προσθήκη 4 mL διαλύματος εκχύλισης

- Ανάδευση σε συσκευή Turax στις 8.000 στροφές για μερικά δευτερόλεπτα
- Εκχύλιση του ομογενοποιημένου διαλύματος υπό ανάδευση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία 25 °C
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 5000 στροφές
- Λήψη του υπερκείμενου (4mL)
- Επανάληψη της διαδικασίας -2η φορά- για το ίζημα από την αρχή, δηλαδή από την προσθήκη 5 mL διαλύματος εκχύλισης
- Εκ νέου λήψη του υπερκείμενου μετά τη φυγοκέντρηση
- Προσθήκη του υπερκείμενου στο προηγούμενο (4mL+4mL=8mL)
- Επανάληψη της διαδικασίας -3η φορά- για το ίζημα από την αρχή
- Εκ νέου λήψη του υπερκείμενου μετά τη φυγοκέντρηση
- Προσθήκη του υπερκείμενου στο προηγούμενο (8mL+4mL=12mL)
- Απόρριψη του υποκειμένου
- Τελικός όγκος εκχυλίσματος 12 mL (αναλογία ξηρού βάρους-εκχυλίσματος 1:30)

Ο σκοπός που η διαδικασία εκχύλισης επαναλαμβάνεται τρεις φορές συνολικά είναι για να εξασφαλίσουμε ότι στο τελικό διάλυμα θα έχει εκχυλιστεί όλη η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων. Για κάθε ομάδα-επανάληψη του κάθε κελιού έγινε ξεχωριστή εκχύλιση. Κατά συνέπεια στο τέλος της διαδικασίας υπήρχαν για κάθε κελί (επέμβαση) τρία διαφορετικά εκχυλίσματα (επανάληψη).

Αραίωση

Εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων στους φλοιούς και στα γίγαρτα πραγματοποιήθηκε αραίωση των αρχικών εκχυλισμάτων. Η αραίωση που έγινε στους φλοιούς και στα γίγαρτα ήταν 1:30 σε τελικό όγκο διαλύματος 10 L.

Κατά συνέπεια για την παρασκευή του αραιωμένου διαλύματος γιγάρτων αραιώθηκαν 0,33 mL εκχυλίσματος σε 9,67 mL διαλύτη (μεθανόλη) και 0,33 mL πυκνού εκχυλίσματος φλοιών σε 9,67 mL διαλύτη (μεθανόλη). Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη καθαρότητας HPLC.

2.10 Μέτρηση ολικών φαινολικών ενώσεων με τη μέθοδο ILAND

Αρχή της μεθόδου

Για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων σε φλοιούς και γίγαρτα των ραγών αρχικά πρέπει να γίνει εκχύλιση και στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση στα 280 nm. Η μέτρηση αυτή μπορεί να μην έχει άμεση συσχέτιση με τις τιμές που προκύπτουν κατά την οινοποίηση αλλά μας παρέχει πληροφορίες για το σύνολο των ολικών φαινολικών στη ράγα (φλοιός, σάρκα και γίγαρτα). Εδώ η μέτρηση έλαβε χώρα μόνο σε φλοιούς και γίγαρτα και όχι σε γλεύκος, καθώς η εκχύλιση κάθε φορά του γλεύκους προσδιορίζεται διαφορετικά με το στυλ οινοποίησης (χρόνοι, θερμοκρασίες και τρόποι εκχύλισης) του παραγόμενου οίνου.

Αντιδραστήρια

Διάλυμα HCl 1M. Για την παρασκευή του διαλύματος αραιώθηκε 1:12 πυκνό HCl 12 M σε απιονισμένο νερό.

Προετοιμασία δειγμάτων

Για τους φλοιούς και τα γίγαρτα χρησιμοποιήθηκαν τα αραιωμένα εκχυλίσματα 1:30 που αναφέρθηκαν παραπάνω για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών,

Διαδικασία μέτρησης

Η διαδικασία αυτή είναι κοινή και για τους φλοιούς και για τα γίγαρτα

- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 4000 rpm για 10 λεπτά
- Μεταφορά 0,5 mL από το υπερκείμενο σε δοκιμαστικούς σωλήνες
- Προσθήκη 10 mL HCl 1M
- Ανάδευση με vortex
- Παραμονή σε ηρεμία στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες
- Φωτομέτρηση στα 280nm (κυψελίδα χαλαζία, λάμπα δευτερίου).

Σε έναν άλλο δοκιμαστικό σωλήνα αντί για δείγμα προστέθηκαν 0,5 mL αραιωμένου διαλύματος εκχύλισης (1:30 σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC για φλοιούς και γίγαρτα αντίστοιχα), για μηδενισμό του φωτόμετρου.

Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 280 nm για τις ολικές φαινολικές ενώσεις (κυψελίδα χαλαζία, λάμπα δευτερίου) σε φλοιούς, γίγαρτα. Για κάθε επανάληψη έγιναν 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των ολικών φαινολικών χρησιμοποιήθηκε το γαλλικό οξύ ως πρότυπη ένωση σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων.

2.11 Μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών

Αρχή της μεθόδου

Η μέτρηση συγκέντρωσης συμπυκνωμένων ταννινών με Methyl cellulose είναι ένα μέσο μέτρησης της συγκέντρωσης ταννινών μετά από ομογενοποίηση και εκχύλιση στο κρασί και στα σταφύλια, αλλά και σε άλλα υδατικά διαλύματα (Sarneckis C. *et al.* 2006, Smith P.A.2005). Η συγκεκριμένη μέθοδος μετράει το σύνολο των ταννινών του δείγματος οίνου ή ράγας. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις των ταννινών με άλλα μόρια, όπως η methyl cellulose (μεθυλική κυτταρίνη) και τη δημιουργία αδιάλυτων συμπλόκων, τα οποία καθιζάνουν. Το πολυμερές που χρησιμοποιείται είναι η methyl cellulose και ως εκ τούτου, η δοκιμασία μετρά τις ταννίνες που καθιζάνουν με την methyl cellulose, δηλαδή, μετρά την MCP - ταννίνη . Η δοκιμασία βασίζεται στην αφαίρεση των τιμών απορρόφησης στα 280 nm (A280) των διαλυμάτων με και χωρίς καθίζηση που μετρήθηκαν με την χρήση φασματοφωτομέτρου. Η methyl cellulose δεν απορροφά στα 280nm, και συνεπώς δεν εμποδίζει τις μετρήσεις.

Αντιδραστήρια

- Κορεσμένο διάλυμα ammonium sulfate. Η παρασκευή του διαλύματος γίνεται με προσθήκη 300 mL απιονισμένου νερού σε ποτήρι ζέσεως των 500 mL και προστίθενται κρύσταλλοι θειικού αμμωνίου, υπό συνεχή ανάδευση, μέχρι να μην μπορεί να διαλυθεί άλλο. Συνεχίζεται η προσθήκη των κρυστάλλων μέχρι να υπάρχουν στον πάτο κρύσταλλοι θειικού αμμωνίου πάχους 1,5 cm περίπου.
- Διάλυμα methyl cellulose 0,04%. Η παρασκευή του διαλύματος γίνεται με θέρμανση περίπου 300 ml απιονισμένου νερού στους 80 °C και ψύξη περίπου 700 mL απιονισμένου νερού στους 0-5 °C. Σε ποτήρι ζέσεως προστίθενται τα 300 mL απιονισμένου νερού στους 80 °C και προστίθενται 0,4 g methyl cellulose μέχρι να διαλυθεί τελείως με συνεχή ανάδευση. Το διάλυμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο 0-5 °C και προστίθεται σιγά σιγά το κρύο νερό, αναδεύοντας το

για 20-40 λεπτά. Βγαίνει από το υδατόλουτρο κι αφήνεται υπό ανάδευση για 12 ώρες.

Διαδικασία μέτρησης

Χρησιμοποιήθηκαν τα αραιωμένα εκχυλίσματα 1:30. Η διαδικασία που ακολουθεί είναι κοινή και για τα δύο μέρη της ράγας (φλοιοί, γίγαρτα)

- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 4000 rpm για 10 λεπτά
- Χρησιμοποιούνται 2 πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρου (control και treatment):

control: 1 mL αραιωμένου εκχυλίσματος + 2 mL ammonium sulfate + H₂O (τελ. V = 10mL). Ανάδευση με Vortex και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.

treatment: 1 mL αραιωμένου εκχυλίσματος + 3 mL methyl cellulose (ανάδευση σε vortex και παραμονή για 2-3 λεπτά) + 2 mL ammonium sulfate + H₂O (Vτελ = 10 mL). Ανάδευση με Vortex και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.

- Φυγοκέντρηση για 10 min σε 6000 rpm.
- Φωτομέτρηση στα 280 nm (κυψελίδα χαλαζία, λάμπα δευτερίου)

Σε 2 άλλους πλαστικούς σωλήνες αντί για δείγμα προστέθηκε 1 mL αραιωμένου διαλύματος εκχύλισης (1:30 σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC για φλοιούς και για γίγαρτα). Τα διαλύματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για μηδενισμό του φωτόμετρου.

Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 280 nm (κυψελίδα χαλαζία, λάμπα δευτερίου). Για κάθε επανάληψη λήφθηκαν 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους για τα control sample και για τα treatment sample. Υπολογίστηκε η διαφορά των μέσων όρων για κάθε επανάληψη ($A_{280}=ACS-ATS$) και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των συμπυκνωμένων ταννινών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση η κατεχίνη σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων.

2.12 Μέτρηση ολικών φλαβονοειδών ενώσεων

Αρχή της μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου προσδιορισμού των ολικών φλαβονοειδών με το χλωριούχο αργίλιο βασίζεται στο ότι το AlCl_3 σχηματίζει σταθερά όξινα σύμπλοκα με την κετονομάδα στη θέση C4 και την υδροξυλική ομάδα είτε της θέσης C3 είτε της θέσης C5 των φλαβονών και φλαβονολών. Επιπρόσθετα, σχηματίζει όξινα, ασταθή, σύμπλοκα με της όρθο-υδροξυλομάδες των δακτυλίων A και B των φλαβονοειδών.

Αντιδραστήρια

- Υδατικό διάλυμα NaNO_2 5% w/v. Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίζονται 5 g NaNO_2 και διαλύονται σε τελικό όγκο 100 mL απιονισμένου νερού.
- Υδατικό διάλυμα AlCl_3 10% w/v. Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίζονται 10 gr AlCl_3 και διαλύονται σε τελικό όγκο 100 mL απιονισμένου νερού, κάτω από απαγωγό.
- Διάλυμα NaOH 1N

Προετοιμασία δειγμάτων

Για τους φλοιούς και τα γίγαρτα χρησιμοποιήθηκαν τα αραιωμένα εκχυλίσματα που αναφέρθηκαν στην αρχή του κεφαλαίου.

Διαδικασία μέτρησης

Η διαδικασία αυτή είναι κοινή και για τους φλοιούς και για τα γίγαρτα. Σε ένα πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρου:

- Προσθήκη 2 mL απεσταγμένο νερό
- Προσθήκη 0,5 mL αραιωμένου εκχυλίσματος
- Ανάδευση με vortex και προσθήκη 0,15 mL NaNO₂ 5%w/v
- Ανάδευση με vortex και μετά από 5 λεπτά προσθήκη 0,15 mL AlCl₃ 10% w/v
- Ανάδευση με vortex και μετά από 6 λεπτά προσθήκη 1 mL NaOH 1N
- Ανάδευση με vortex και μετά προσθήκη 1,2 mL απεσταγμένο νερό
- Ανάδευση με vortex και μέτρηση των δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 510 nm (πλαστική κυψελίδα, λάμπα αλογόνου)

Σε έναν άλλο δοκιμαστικό σωλήνα αντί για αραιωμένο εκχύλισμα προστέθηκαν 0,5 mL αραιωμένου διαλύματος εκχύλισης (1:30 σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC) κι ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για μηδενισμό του φωτόμετρου.

Για κάθε επανάληψη προέκυψαν 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των ολικών φλαβονοειδών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση η κατεχίνη.

2.13 Μέτρηση των ολικών φλαβονολών

Αρχή της μεθόδου

Οι αλδεΐδες αντιδρούν με τις μ-διφαινόλες προς σχηματισμό ενός έγχρωμου (βαθύ μπλε) ιόντος υπό όξινες συνθήκες. Η αντίδραση έχει αξιοποιηθεί για την εκτίμηση των φλαβονολών καθώς ο δακτύλιος A έχει λειτουργικότητα μ-διφαινόλης. Οι Thies και Fischer (1971) πρώτη φορά ανέφεραν το βαθύ μπλε χρωματισμό της 4-DMACA μετά από αντίδραση της με τις κατεχίνες. Μια άλλη ευρύτερα διαδεδομένη μέθοδος για τον προσδιορισμό των φλαβονολών είναι αυτή που ως αλδεΐδη χρησιμοποιείται η αρωματική ένωση βανιλίνη. Όμως, η μέθοδος 4-DMACA έχει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι της βανιλίνης καθώς παρέχει μεγαλύτερη ευαισθησία και ακρίβεια και δεν υπάρχει καμία παρεμβολή από τις ανθοκυάνες.

Αντιδραστήρια

- Σκόνη 4-DMACA 100 mg
- Διάλυμα 25% v/v HCl 1N
- Μεθανόλη Καθαρότητας HPLC
- Παρασκευή διαλύματος 4-DMACA 0,1% w/v. Για την παρασκευή του διαλύματος αυτού, αναμίχθηκαν 8,5 mL HCl με 91.65 mL μεθανόλης και στη συνέχεια διαλύθηκαν τα 100 mg 4-DMACA υπό συνεχή ανάδευση.

Προετοιμασία δειγμάτων

Για τους φλοιούς και τα γίγαρτα χρησιμοποιήθηκαν τα αραιωμένα εκχυλίσματα που αναφέρθηκαν στην αρχή του κεφαλαίου. Όμως, επειδή η συγκέντρωση των φλαβονολών είναι ιδιαίτερα υψηλή στην συγκεκριμένη ποικιλία έγινε επιπλέον αραιώση στο ήδη αραιωμένα εκχυλίσματα τόσο των φλοιών όσο και των γιγάρτων

με μεθανόλη καθαρότητας HPLC. Η τελική αραιώση των φλοιών ήταν 1: 60 και των γιγάρτων 1:120.

Διαδικασία μέτρησης

Η διαδικασία αυτή είναι κοινή και για τους φλοιούς και για τα γίγαρτα. Σε ένα πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρου:

- ✓ Μεταφορά 1 mL διαλύματος 4-(Dimethylamino)cinnamaldehyde
 - ✓ Προσθήκη 200 μ L αραιωμένου εκχυλίσματος κι έπειτα ανάδευση με vortex
- ✓ Παραμονή των δειγμάτων σε ηρεμία για 10 λεπτά
 - ✓ Μέτρηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 640 nm

Σε έναν άλλο δοκιμαστικό σωλήνα αντί για αραιωμένο εκχύλισμα προστέθηκαν 200 μ L αραιωμένου διαλύματος εκχύλισης (1:60 σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC για τους φλοιούς και 1:120 για τα γίγαρτα αντίστοιχα) κι ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για μηδενισμό του φωτόμετρου.

Για κάθε επανάληψη παρήχθησαν 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των ολικών φλαβονολών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση η κατεχίνη σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων.

2.14 Μέτρηση ολικών φλαβονών και φλαβονολών

Αρχή της μεθόδου - Αντιδραστήρια

Η αρχή της μεθόδου αναφέρεται παραπάνω στη μέτρηση των ολικών φλαβονοειδών.

- Μεθανόλη Καθαρότητας HPLC
- Διάλυμα AlCl_3 5% w/v. Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίζονται 5 g AlCl_3 και διαλύονται σε τελικό όγκο 100 mL μεθανόλης καθαρότητας HPLC, κάτω από απαγωγό.

Προετοιμασία δειγμάτων

Στη μέτρηση αυτή δεν χρησιμοποιήθηκε το αραιωμένο εκχύλισμα όπως στις υπόλοιπες μετρήσεις, καθώς η συγκέντρωση των φλαβονολών θα ήταν δύσκολα ανιχνεύσιμη. Για αυτό χρησιμοποιήθηκε κατευθείαν το πυκνό εκχύλισμα.

Διαδικασία μέτρησης

- Σε ένα πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρου:
- Μεταφέρθηκαν 0,2 mL εκχυλίσματος
- Προσθήκη 2 mL μεθανόλης κι ακολουθεί ανάμιξη
- Προσθήκη 0,1 mL διάλυμα AlCl_3 κι ακολουθεί ανάμιξη
- Προσθήκη 2,7 mL μεθανόλη κι ακολουθεί ανάμιξη
- Παραμονή του δείγματος για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ηρεμία
- Μέτρηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 425 nm

- Σε έναν άλλο δοκιμαστικό σωλήνα αντί για το εκχύλισμα προστέθηκαν 0,2 mL διαλύματος εκχύλισης ή μεθανόλης καθαρότητας HPLC κι ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για μηδενισμό του φωτόμετρου.
- Για κάθε επανάληψη προέκυψαν 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των ολικών φλαβονών και φλαβονολών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση η ρουτίνη σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων.

2.15 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power/Αντιοξειδωτική Ισχύς Αναγωγής Τρισθενούς Σιδήρου) αναπτύχθηκε από τους Benzie και Strein το 1996 και στηρίζεται στο γεγονός το ότι σε χαμηλό pH παρακολουθείται η μείωση ενός συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου(με έντονο κυανό ρώμα) με μέτρηση της μεταβολής της απορρόφησης στα 593 nm. Η αλλαγή στην απορρόφηση σχετίζεται με την αναγωγική ισχύ των αντιοξειδωτικών ενώσεων που υπάρχουν στο μίγμα αντίδρασης και δίνουν ηλεκτρόνια.

Αντιδραστήρια

- Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος συγκέντρωσης 0,3 M και pH= 3,6
- Διάλυμα TPTZ 10 mM/L σε διάλυμα HCl 40 mM/L
- Διάλυμα FeCl₃·6H₂O 20 mM/L
- HCl 40 mM

Προετοιμασία δειγμάτων

Για τους φλοιούς έγινε αραιώση του αρχικού εκχυλίσματος σε αναλογία 1:60 με μεθανόλη καθαρότητας HPLC, ενώ στα γίγαρτα 1:120 αντίστοιχα.

Διαδικασία μέτρησης

Το διάλυμα εργασίας FRAP παρασκευάζεται ημερησίως με ανάμιξη:

- 25 mL ρυθμιστικού διαλύματος
- 2,5 mL TPTZ
- 2,5 mL $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Το διάλυμα εργασίας FRAP θερμαίνεται στους 37 °C και λαμβάνεται η τιμή απορρόφησης στα 593 nm ως τυφλό

Σ ένα πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρου

- Μεταφορά 0,1 mL αραιωμένου εκχυλίσματος
- Προσθήκη 1,1 mL διαλύματος FRAP και παραμονή του μίγματος στο σκοτάδι για 10 min σε θερμοκρασία 37 °C
- Μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος στα 593 nm

Σε άλλους δύο δοκιμαστικούς σωλήνες αντί για αραιωμένο εκχύλισμα προστέθηκαν 0,2 mL αραιωμένου διαλύματος εκχύλισης (1:60 και 1:120 για φλοιούς και γίγαρτα αντίστοιχα σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC) κι ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για μηδενισμό του φωτόμετρου.

Για κάθε επανάληψη παρθήκαν 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των αντιοξειδωτικών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση το αντιοξειδωτικό διάλυμα trolox σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων.

2.16 Μέτρηση ολικών ο-διαφαινολών

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός των ολικών ο-διφαινολών έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Roussos και Pontikis (2001). Η μέθοδος βασίζεται στη ξεχωριστή μέτρηση απορροφήσεων στα 370nm των διαλυμάτων με και χωρίς προσθήκη $\text{NaMoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Αντιδραστήρια

- Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M και pH=5,8
- 5% w/v $\text{NaMoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Προετοιμασία δειγμάτων

Στη μέτρηση αυτή δεν χρησιμοποιήθηκε το αραιωμένο εκχύλισμα όπως στις υπόλοιπες μετρήσεις, καθώς η συγκέντρωση των ο-διφαινολών θα ήταν δύσκολα ανιχνεύσιμη. Για αυτό χρησιμοποιήθηκε κατευθείαν το πυκνό εκχύλισμα.

Διαδικασία μέτρησης

Σ' ένα πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρου προστίθενται

- 900 μL απεσταγμένο νερό, 100 μL εκχυλίσματος του δείγματος και ακολούθως καλή ανάδευση
- 1 mL φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα με συγκέντρωση 0,1 M και pH=5,8
- Ανάδευση και προσθήκη 2 mL απεσταγμένου νερού

Σ' ένα δεύτερο πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρου προστίθενται

- 900 μL απεσταγμένο νερό, 100 μL εκχυλίσματος του δείγματος και ακολούθως καλή ανάδευση
- 1 mL φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα με συγκέντρωση 0,1 M και pH=5,8 και ακολούθως καλή ανάδευση
- Προσθήκη 2 mL $\text{NaMoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ περιεκτικότητας 5% w/v
- Στη συνέχεια ακολουθεί πάλι ανάδευση και τέλος παραμονή των δειγμάτων σε ηρεμία για 15 min πριν τη μέτρηση
- Μέτρηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 370 nm

Σε έναν άλλο δοκιμαστικό σωλήνα αντί για εκχύλισμα έγινε προσθήκη 0,1 mL μεθανόλης ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για μηδενισμό του φωτόμετρου.

Για κάθε επανάληψη προέκυψαν 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους. Υπολογίστηκε η διαφορά των μέσων όρων για τα δείγματα με και χωρίς το NaMoO_4 και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των ολικών ο-διφαινολών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση το καφεϊκό οξύ σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων.

2.17 Προσδιορισμός μεμονωμένων οξέων με HPLC

Προετοιμασία δειγμάτων

Για τον προσδιορισμό των μεμονωμένων οξέων(τρυγικό, μηλικό, ασκορβικό ηλεκτρικό, και φουμαρικό χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα χυμός σταφυλιών.

Διαδικασία μέτρησης

- ✓ Προσθήκη 0,5 mL δείγματος σε πλαστικό σωλήνα που περιέχει 2 mL μεταφωσφορικό νάτριο NaPO_3 (περιεκτικότητας 5% w/v) (αραίωση 1:5)
- ✓ Ανάδευση
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 5.000 rpm για 5 min
- ✓ Παραλαβή υπερκείμενου
- ✓ Φιλτράρισμα του τελικού διαλύματος με φίλτρο 0,2 μm και ταυτόχρονη μεταφορά του σε κατάλληλους περιέκτες για αυτόματο δειγματολήπτη
- ✓ Τοποθέτηση του περιέκτη στο όργανο της HPLC

Για κάθε επανάληψη έλαβε χώρα μία μέτρηση στην HPLC, καθώς το όργανο παρουσιάζει μεγάλη ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Χρησιμοποιώντας τις πρότυπες καμπύλες, βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων σε κάθε οξύ ξεχωριστά. Για την ταυτοποίηση των κορυφών για κάθε οξύ χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες ενώσεις, από τις οποίες έγιναν οι πρότυπες καμπύλες αναφοράς, για την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των οξέων.

Στη συνέχεια, ακολούθησε ταυτοποίηση των οξέων στα δείγματα βάση των πρότυπων ουσιών των οξέων, συγκρίνοντας τους χρόνους συγκράτησης (tR) και το φάσμα απορρόφησης. Τα οξέα που ταυτοποιήθηκαν είναι το τρυγικό, το μηλικό, το ασκορβικό, το ηλεκτρικό, το φουμαρικό.

2.18 Στατική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων έγινε με το πρόγραμμα Jump 8.0 (SAS Institute Inc). Η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με ανάλυση της διασποράς (ANOVA). Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο Tukey's test, σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. Στην παράθεση των αποτελεσμάτων οι μέσοι όροι ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα της λατινικής αλφαβήτου υποδηλώνοντας την ύπαρξη ή μη στατιστικά σημαντικής διαφοράς και από το στατιστικό σφάλμα του μέσου.

3. Αποτελέσματα

3.1 Μετρήσεις γλευκογραφικών χαρακτηριστικών

Πίνακας 1: Μετρήσεις γλευκογραφικών χαρακτηριστικών

Σύστημα Μόρφωσης	Επέμβαση	Ολική ογκομετρούμενη οξύτητα (g τρυγικούL ⁻¹)	Ενεργός οξύτητα pH	Ολικά διαλυτά στερεά συστατικά (Brix ^ο)	Αργινίνη(mg αργινίνης /ml γλεύκους)	Προλίνη(mg προλίνης/ml γλεύκους)
ΑΣΥΡΤΙΚΟ						
Γραμμικό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	8,38±0,09 a	2,77±0,03 c	20,97±0,03 b	0,18±0,009 a	0,023±0,003 ab
	Καολίνης	7,48±0,11 b	3,19±0,01 a	22,9±0,03 a	0,21±0,014 a	0,02±0,001 b
Παραδοσιακό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	7,55±0,09 b	3,08±0,005 b	20,9±0,05 b	0,19±0,003 a	0,02±0,001 b
	Καολίνης	7,32±0,07 b	3,02±0,003 b	19,2±0,13 c	0,16±0,024 a	0,03±0,001 a
ΑΗΔΑΝΙ						
Γραμμικό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	4,28±0,09 a	3,38±0,003 b	20,2±0,058 a	0,39±0,016 a	0,037±0,003 a
	Καολίνης	4,51±0,07 a	3,72±0,006 a	19,43±0,033 b	0,31±0,015 b	0,04±0,001 a

Τα ολικά σάκχαρα στο Ασύρτικο διαφέρουν μεταξύ των επεμβάσεων με το μάρτυρα στη περίπτωση του γραμμικού συστήματος να διατηρεί χαμηλότερη τιμή και ψηλότερη στο παραδοσιακό σύστημα αντίστοιχα. Ο καολίνης έχει βρεθεί ότι καθυστερεί την ωρίμανση άρα η περίπτωση του παραδοσιακού συστήματος συμφωνεί με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Για το Αηδάνι τα σάκχαρα έχουν εξίσου υψηλότερη τιμή στο μάρτυρα.

Η ολική οξύτητα διαφέρει μεταξύ των επεμβάσεων στη περίπτωση του γραμμικού συστήματος με το δείγμα από τον Καολίνη να εμφανίζει χαμηλότερη οξύτητα και αρκετά πιο υψηλό pH αντίστοιχα, ενώ διαφορά στην ογκομετρούμενη οξύτητα παρατηρούμε και μεταξύ των συστημάτων με το παραδοσιακό σύστημα να έχει τις χαμηλότερες τιμές. Το Αηδάνι εμφανίζει στατιστικά σημαντικές διαφορές στο pH, με την επέμβαση με τον καολίνη να έχει υψηλότερη τιμή.(κακο για παλάιωση γιατί είναι πολύ ψηλό) .

Σχετικά με τα αμινοξέα του γλεύκους από τη ποικιλία Ασύρτικο παρατηρείται ότι η προλίνη στο παραδοσιακό σύστημα μόρφωσης εντοπίστηκε με μεγαλύτερη τιμή για το δείγμα του Καολίνη, ενώ η αργινίνη δεν εμφάνισε διαφορές ούτε ανάμεσα στις επεμβάσεις ούτε στα συστήματα μόρφωσης. Στο Αηδάνι η αργινίνη στο γλεύκος διαφέρει μεταξύ των επεμβάσεων, με χαμηλότερη τιμή στο δείγμα του Καολίνη.

3.2 Μηχανικές αναλύσεις σταφυλής και ράγας

Πίνακας 2 : Μηχανικές αναλύσεις σταφυλής και ράγας

Σύστημα Μόρφωσης	Επέμβαση	Μήκος ράγας mm	Πλάτος ράγας mm	Βάρος 30 ραγών gr	Ποσοστό Υγρασίας	Μήκος Σταφυλής cm	Πλάτος Σταφυλή cm	Βάρος Σταφυλής gr
ΑΣΥΡΤΙΚΟ								
Γραμμικό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	15,75±0,40 a	14,27±0,27 a	61,67±2,9 b	72,7±0,5 a	12,83±0,73 ab	7,83±0,88 a	158,33±9,3 a
	Καολίνης	16,53±0,86 a	13,92±0,42 a	75,33±2,01 a	72,7±0,64 a	14,76±0,37 a	8,64±0,46 a	208,1±6,27 a
Παραδοσιακό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	16,57±0,24 a	14,19±0,12 a	71,67±2,3 ab	71,44±0,17 a	12,16±0,73 b	6,83±0,33 a	163,24±10,6 ab
	Καολίνης	15,92±0,14 a	14,91±0,05 a	70,33±1,9 ab	71,85±0,47 a	15±0,29 a	8,17±0,6 a	149±10,6 b
ΑΗΔΑΝΙ								
Γραμμικό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	14,26±0,29 a	13,84±0,33 a	56,08±1,2 a	72,53±0,31 a	15,41±0,46 a	14,04±0,01 a	352,75±16,2 a
	Καολίνης	14,04±0,41 a	13,63±0,33 a	68,46±0,33 a	71,88±0,51 a	17,33±0,73 a	10,5±0,01 a	352,33±12,2 a

Στο Ασύρτικο στις μετρήσεις του βάρους, του μήκους και του πλάτους των σταφυλών δεν σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των συστημάτων μόρφωσης, και μεταξύ των επεμβάσεων. Ως προς την ράγα του Ασύρτικου ο μάρτυρας του γραμμικού συστήματος παρουσίασε χαμηλότερες τιμές μήκους και βάρους, ενώ το μήκος και το πλάτος της σταφυλής εμφανίστηκε με μεγαλύτερες τιμές για τις επεμβάσεις με το καολίνη και στα δύο συστήματα μόρφωσης. Στο Αηδάνι δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις μηχανικές αναλύσεις ράγας και σταφυλής. Στο γραμμικό σύστημα μόρφωσης η εφαρμογή του καολίνης αύξησε το βάρος της ράγας και το βάρος της σταφυλής, ενώ στο παραδοσιακό ευνόησε το μήκος της σταφυλής.

3.3 Μετρήσεις μεμονωμένων οξέων με HPLC

Πίνακας 3 : Μετρήσεις μεμονωμένων οξέων

Σύστημα Μόρφωσης	Επέμβαση	Acid must μg tartaric acid/mg must	Acid must μg malic acid/mg must	Acid must μg ascorbic acid/mg must	Acid must μg succinic acid/mg must	Acid must μg fumaric acid/mg must
ΑΣΥΡΤΙΚΟ						
Γραμμικό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	9268,79 \pm 76,5 a	965,87 \pm 6,7 a	56,01 \pm 3,5 a	2,22 \pm 0,08 a	28,06 \pm 3,1 b
	Καολίνης	7999,15 \pm 88,2 a	961,89 \pm 17,9 a	51,4 \pm 0,67 a	1,94 \pm 0,44 a	37,2 \pm 1,75 b
Παραδοσιακό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	6261,64 \pm 55,3 a	1077,06 \pm 18,5 a	46,32 \pm 0,29 a	2,5 \pm 0,22 a	51,37 \pm 1,72 a
	Καολίνης	8800,99 \pm 79,6 a	1012,43 \pm 6,3 a	60,01 \pm 1,21 a	1,55 \pm 0,06 a	14,39 \pm 1,03 c
ΑΗΔΑΝΙ						
Γραμμικό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	5646,95 \pm 90,9 a	1833,49 \pm 15,2 a	35,19 \pm 2,4 a	1,89 \pm 0,18 a	47,55 \pm 2,1 a
	Καολίνης	6593,93 \pm 101,1 a	819,46 \pm 10,4 b	34,15 \pm 2,09 a	1,57 \pm 0,19 b	23,7 \pm 1,28 b

Τα οργανικά οξέα δεν φαίνεται να έχουν επηρεαστεί ιδιαίτερα από την επέμβαση με το καολίνη, με το τρυγικό οξύ, το κύριο οξύ της σταφυλής να έχει τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και ακολούθως το μηλικό. Η μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά που παρατηρείται στο Ασύρτικο είναι στο φουμαρικό οξύ στο παραδοσιακό σύστημα μόρφωσης όπου το δείγμα από τον καολίνη εμφανίζει χαμηλότερη συγκέντρωση του οξέος. Όμοια αποτελέσματα για το φουμαρικό παρατηρούνται και στο Αηδάνι, ενώ φαίνεται ότι ο καολίνης επηρέασε αρνητικά και τη συγκέντρωση του μηλικού

3.4 Φασματοφωτομετρικές αναλύσεις

3.4.1 Μετρήσεις συμπυκνωμένων ταννινών

Πίνακας 4 : Μετρήσεις συμπυκνωμένων ταννινών

Σύστημα Μόρφωσης	Επέμβαση	Ολικές ταννίνες φλοιών mg catechin/g νωπού ιστού	Ολικές ταννίνες γιγάρτων mg catechin/g νωπού ιστού
ΑΣΥΡΤΙΚΟ			
Γραμμικό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	2,89±0,12 ab	80,96±1,37 b
	Καολίνης	2,46±0,24 ab	59,31±2,3 c
Παραδοσιακό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	2,42±0,05 b	105,45±0,86 a
	Καολίνης	3,26±0,23 a	99,81±3,33 a
ΑΗΔΑΝΙ			
Γραμμικό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	2,34±0,15 a	78±0,86 a
	Καολίνης	1,41±0,17 b	51,9±3,11 b

Οι ταννίνες των γιγάρτων ανάμεσα στις δύο επεμβασεις διαφέρουν στατιστικά σημαντικά για τη περίπτωση του γραμμικού συστήματος μόρφωσης στο Ασύρτικο, και για το Αηδάνι ,με την εφαρμογή του καολίνη να διατηρεί χαμηλότερη τιμή. Οι ταννίνες των γιγάρτων ανάμεσα στα δύο συστήματα μόρφωσης βρίσκονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο παραδοσιακό σύστημα μόρφωσης. Όσον αφορά τις ταννίνες των φλοιών, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά οι επεμβάσεις στο παραδοσιακό σύστημα, με χαμηλότερη τιμή στο μάρτυρα και στο Αηδάνι με χαμηλότερη τιμή για την εφαρμογή του καολίνη. Σχετικά με τις συμπυκνωμένες ταννίνες , φαίνεται ότι στο Αηδάνι η εφαρμογή του καολίνη δεν επηρέασε θετικά τη συγκέντρωσή τους τόσο στα γίγαρτα όσο και στους φλοιούς, ενώ στο Ασύρτικο παρατηρήθηκε στο παραδοσιακό αύξηση για τις ταννίνες των φλοιών στα δείγματα από τον Καολίνη.

3.4.2 Μετρήσεις ολικών φλαβονοειδών

Πίνακας 5: Μετρήσεις ολικών φλαβονοειδών

Σύστημα Μόρφωσης	Επέμβαση	Ολικά φλαβονοειδή φλοιων mg catechin/g νωπού ιστού	Ολικά φλαβονοειδή γιγάρτων mg catechin/g νωπού ιστού
ΑΣΥΡΤΙΚΟ			
Γραμμικό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	20,25±0,48 a	98,58±4,3 a
	Καολίνης	21,09±0,54 a	40,15±1,55 d
Παραδοσιακό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	15,72±0,28 b	63,05±3,00 c
	Καολίνης	21,34±0,96 a	81,68±2,69 b
ΑΗΔΑΝΙ			
Γραμμικό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	13,54±0,37 a	75,15±1,91 a
	Καολίνης	13,16±0,31 a	52,6±3,52 b

Τα ολικά φλαβονοειδή των γιγάρτων εμφανίζονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, ενώ διαφέρουν στατιστικά σημαντικά και στα δύο συστήματα μόρφωσης, με την εφαρμογή του καολίνης να έχει τη χαμηλότερη συγκέντρωση στο γραμμικό και υψηλότερη στο παραδοσιακό, συγκριτικά με το μάρτυρα. Στο Αηδάνι παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά με το δείγμα από την εφαρμογή του καολίνης να εμφανίζει χαμηλότερη συγκέντρωση ολικών φλαβονοειδών γιγάρτων. Τα ολικά φλαβονοειδή των φλοιών διαφέρουν στη περίπτωση του παραδοσιακού συστήματος, όπου στην εφαρμογή με το καολίνης έχουν την υψηλότερη συγκέντρωση. Η εφαρμογή με τον καολίνης πιθανότατα ευνόησε τη σύνθεση ολικών φλαβονοειδών στους φλοιούς και στα γιγάρτα για το παραδοσιακό σύστημα.

3.4.3 Μετρήσεις ο-διφαινολών

Πίνακας 6: Μετρήσεις ο-διφαινολών

Ποικιλία-σύστημα Μόρφωσης	Επέμβαση	Ο-διφαινόλες φλοιών mg caffeic acid/g νωπού ιστού	Ο-διφαινόλες γιγάρτων mg caffeic acid/g νωπού ιστού
ΑΣΥΡΤΙΚΟ			
Γραμμικό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	15,56±0,29 a	47,52±0,65 ab
	Καολίνης	14,51±0,28 a	48,65±0,67 a
Παραδοσιακό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	13,18±0,3 a	44,33±0,8 bc
	Καολίνης	13,59±0,34 a	41,77±0,69 c
ΑΗΔΑΝΙ			
Γραμμικό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	6,88±0,13 a	28,43±0,85 a
	Καολίνης	6,87±0,44 a	29,18±1,03 a

Οι ο-διφαινόλες στα γίγαρτα και στη ράγα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στις επεμβάσεις και στις δύο ποικιλίες.

3.4.4 Μετρήσεις ολικών φλαβανολών

Πίνακας 7: Μετρήσεις ολικών φλαβανολών

Σύστημα Μόρφωσης	Επέμβαση	Ολικές φλαβανόλες φλοιών mg catechin/g νωπού ιστού	Ολικές φλαβανόλες γιγάρτων mg catechin/g νωπού ιστού
ΑΣΥΡΤΙΚΟ			
Γραμμικό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	7,62±0,19 a	48,97±1,16 a
	Καολίνης	8,11±0,5 a	36,62±0,83 c
Παραδοσιακό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	7,0±0,11 a	43,13±0,56 b
	Καολίνης	7,86±0,19 a	43,62±0,22 b
ΑΗΔΑΝΙ			
Γραμμικό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	5,90±0,38 a	24,17±0,84 a
	Καολίνης	6,46±0,58 a	25,16±0,54 a

Οι συγκεντρώσεις των ολικών φλαβανολών δεν φαίνεται να επηρεάζονται ιδιαίτερα από την εφαρμογή με καολίνη, εκτός από την περίπτωση των γιγάρτων, στο γραμμικό σύστημα μόρφωσης όπου παρουσιάζονται μειωμένες τιμές για την εφαρμογή με καολίνη.

3.4.5 Μετρήσεις ολικών φαινολικών

Πίνακας 8: Μετρήσεις ολικών φαινολικών

Σύστημα Μόρφωσης	Επέμβαση	Ολικά φαινολικά φλοιών (mg γαλλικού οξέος/ gr νωπού ιστού)	Ολικά φαινολικά γιγάρτων (mg γαλλικού οξέος/ gr νωπού ιστού)
ΑΣΥΡΤΙΚΟ			
Γραμμικό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	7,43±0,18 c	26,54±0,85 a
	Καολίνης	8,54±0,08 b	25,96±0,69 ab
Παραδοσιακό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	7,49±0,05 c	22,19±1,25 b
	Καολίνης	9,57±0,21 a	22,95±0,56 ab
ΑΗΔΑΝΙ			
Γραμμικό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	3,41±0,27 a	20,70±0,36 a
	Καολίνης	4,59±0,36 a	17,80±0,09 b

Τα ολικά φαινολικά των γιγάρτων παρατηρούνται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τους φλοιούς και συγκριτικά με τις δύο επεμβάσεις στο Αηδάνι η εφαρμογή του καολίνης είναι σε χαμηλότερη τιμή. Για το Ασύρτικο δεν υπάρχουν διαφορές στα ολικά φαινολικά των γιγάρτων ενώ στους φλοιούς και για τα δύο συστήματα μόρφωσης τα ολικά φαινολικά βρίσκονται σε υψηλότερες περιεκτικότητες στην εφαρμογή του καολίνης. Φαίνεται λοιπόν, ότι η εφαρμογή του καολίνης ευνόησε τη βιοσύνθεση ολικών φαινολικών στους φλοιούς, για το Ασύρτικο.

3.4.6 Μετρήσεις ολικών φλαβονών και φλαβονολών

Πίνακας 9: Μετρήσεις ολικών φλαβονών και φλαβονολών

Σύστημα Μόρφωσης	Επέμβαση	Ολικές φλαβόνες και φλαβονόλες φλοιών mg ρουτίνης/ g νωπού ιστού	Ολικές φλαβόνες και φλαβονόλες γιγάρτων mg ρουτίνης/ g νωπού ιστού
ΑΣΥΡΤΙΚΟ			
Γραμμικό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	1,72±0,02 b	0,74±0,01 b
	Καολίνης	1,93±0,05 a	1,02±0,02 a
Παραδοσιακό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	1,55±0,02 c	0,73±0,02 b
	Καολίνης	1,59±0,01 c	0,68±0,01 b
ΑΗΔΑΝΙ			
Γραμμικό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	1,41±0,04 a	1,03±0,04 a
	Καολίνης	1,15±0,03 b	0,86±0,08 a

Οι ολικές φλαβόνες και φλαβονόλες τόσο στους φλοιούς όσο και στα γίγαρτα παρατηρήθηκαν σε μεγαλύτερες περιεκτικότητες για την επέμβαση με το καολίνη στο γραμμικό σύστημα μόρφωσης, ενώ η περιεκτικότητα τους στους φλοιούς των ραγών ήταν μεγαλύτερη για τον μάρτυρα στο Αηδάνι. Η εφαρμογή με καολίνη ευνόησε τη βιοσύνθεση των φλαβονών και των φλαβανολών στα γίγαρτα και στους φλοιούς για το γραμμικό σύστημα μόρφωσης.

3.4.7 Μετρήσεις αντιοξειδωτικής ικανότητας

Πίνακας 10: Μετρήσεις αντιοξειδωτικής ικανότητας

Σύστημα Μόρφωσης	Επέμβαση	Ολικά αντιοξειδωτικά φλοιών mg trolox/g νωπού ιστού	Ολικά αντιοξειδωτικά γιγάρτων mg trolox/g νωπού ιστού
ΑΣΥΡΤΙΚΟ			
Γραμμικό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	43,09±0,59 b	263,94±3,41 a
	Καολίνης	45,04±0,9 ab	272,12±0,39 a
Παραδοσιακό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	42,03±0,7 b	290,94±1,97 a
	Καολίνης	48,62±1,1 a	244,02±1,67 a
ΑΗΔΑΝΙ			
Γραμμικό Σύστημα Μόρφωσης	Μάρτυρας	32,77±0,45 a	222,09±2,41 a
	Καολίνης	34,99±0,83 a	168,58±2,61 b

Τα γίγαρτα εμφανίζουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ολικών αντιοξειδωτικών σε σχέση με τους φλοιούς. Στο Αηδάνι τα ολικά αντιοξειδωτικά είναι σε υψηλότερη περιεκτικότητα για το μάρτυρα, κάτι το οποίο συμφωνεί με τα παραπάνω αποτελέσματα για τις διάφορες φαινολικές ενώσεις στα γίγαρτα. Για τη ποικιλία Ασύρτικο με το παραδοσιακό σύστημα μόρφωσης τα αντιοξειδωτικά των φλοιών έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα για την εφαρμογή με καολίνη, ενώ δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα υπόλοιπα δείγματα.

4. Συμπεράσματα

Η αύξηση της θερμοκρασίας και η σημαντική έλλειψη βροχοπτώσεων έχουν επηρεάσει τον ήδη ξηρομορφικό χαρακτήρα του αμπελώνα της Σαντορίνης. Η παραγωγή μειώνεται, κάθε χρόνο και περισσότερο και έτσι καθίσταται απαραίτητη η εύρεση νέων οικονομικών αλλά και οικολογικών λύσεων. Η εφαρμογή με Καολίνη έχει δώσει θετικά αποτελέσματα στη μείωση της θερμοκρασίας του φύλλου και στην αντιμετώπιση του υδατικού ελλείμματος (Glenn et al., 2002, Glenn et al., 2003). Στη παρούσα μελέτη, εξετάζονται οι διαφορές στη σύσταση των ραγών, η περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ενώσεις, καθώς και διαφορές στους μορφομετρικούς τους χαρακτήρες. Σχετικά με τα γλευκογραφικά χαρακτηριστικά τα ολικά σάκχαρα στο Ασύρτικο διαφέρουν μεταξύ των επεμβάσεων με το καολίνη στη περίπτωση του παραδοσιακού συστήματος να διατηρεί χαμηλότερη τιμή, όπως έχει παρατηρηθεί και για τη ποικιλία Cabernet Sauvignon (Glenn et al. 2010). Για το Αηδάνι τα σάκχαρα έχουν εξίσου υψηλότερη τιμή στο μάρτυρα. Βέβαια καθυστέρηση στην ωρίμανση δεν παρατηρείται για τη περίπτωση του γραμμικού συστήματος μόρφωσης, όπως συμβαίνει και σε μελέτες της επίδρασης του καολίνη στο Viognier (Shellie et al. 2018). Σύμφωνα με τους Shellie and Glenn. 2008 η μείωση της φωτοσύνθεσης στην εφαρμογή με καολίνη περιόρισε τη συγκέντρωση και σακχάρων και οδήγησε σε χαμηλότερα διαλυτά στερεά κατά τη τεχνολογική ωρίμανση. Στη παρούσα μελέτη φαίνεται να επιβεβαιώνονται αυτά τα αποτελέσματα για το παραδοσιακό σύστημα καθότι σύμφωνα με τη μελέτη της επίδρασης του καολίνη στον ίδιο αμπελώνα (Ξυράφη, Ε. Γ. 2019) ο καολίνης μείωσε σημαντικά τα επίπεδα φωτοσύνθεσης σε όλα τα στάδια ανάπτυξης της ράγας.

Η ολική οξύτητα διαφέρει μεταξύ των επεμβάσεων στη περίπτωση του γραμμικού συστήματος με το δείγμα από τον Καολίνη να εμφανίζει χαμηλότερη οξύτητα και αρκετά πιο υψηλό pH αντίστοιχα όπως συμβαίνει και για τη ποικιλία Cabernet Sauvignon (Lobos et al. 2015). Διαφορές στην ογκομετρούμενη και ενεργή οξύτητα δε παρατηρούμε στο παραδοσιακό σύστημα κάτι το οποίο συμφωνεί και με αντίστοιχη έρευνα για τη ποικιλία Prior (Daniel et al. 2016) όπου η εφαρμογή με καολίνη δεν επηρεάζει τα χαρακτηριστικά του γλεύκου. Το Αηδάνι εμφανίζει στατιστικά σημαντικές διαφορές στο pH, με την επέμβαση με τον καολίνη να έχει υψηλότερη τιμή.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της έρευνας η εφαρμογή με καολίνη παρουσίασε διαφορές στα συστατικά των ραγών και η δράση του επηρεάζεται από τη ποικιλία αλλά και από το σύστημα μόρφωσης. Ο φαινολικός χαρακτήρας αξιολογήθηκε για τις δύο επεμβάσεις παρουσιάζοντας διαφορετικά αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα για το Ασύρτικο με το παραδοσιακό σύστημα μόρφωσης παρατηρήθηκε μια θετική επίδραση και συνολική αύξηση των φαινολικών

συστατικών και της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας, κυρίως στους φλοιούς. Η θετική συσχέτιση της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών των ραγών επιβεβαιώνεται και από άλλη μελέτη (Conde et al. 2016,) όπου οι ερευνητές αποδεικνύουν την επίδραση της εφαρμογής του καολίνη στην έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τα κύρια ένζυμα της βιοσυνθετικής οδού των φλαβονοειδών (*VvPAL1*, *VvC4H1*). Θετική ήταν και η επίδραση στο γραμμικό σύστημα μόρφωσης για τα ολικά φαινολικά, τις φλαβόνες και φλαβονόλες στους φλοιούς. Βέβαια η επιρροή αυτή δεν προσδιορίστηκε στα γίγαρτα, όπου οι συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών ήταν υψηλότερες στο μάρτυρα σε σχέση με τον καολίνη, πιθανότατα γιατί η επέμβαση του καολίνη επηρεάζει διαφορετικά τη βιοσυνθετική πορεία στους φλοιούς και στα γίγαρτα. Στη ποικιλία Αηδάνι τα αποτελέσματα δεν ήταν ιδιαίτερα θετικά, καθότι τόσο στα γίγαρτα όσο και στους φλοιούς η εφαρμογή με καολίνη παρουσίασε τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Συμπερασματικά ο καολίνης παρουσιάζει διαφορετική δράση ανάλογα με την ποικιλία. Προσφέρει θετικά αποτελέσματα στη καθυστέρηση της ωρίμανσης για το Ασύρτικο με το παραδοσικό σύστημα, ιδιαίτερα σημαντικό συμπέρασμα για τον αμπελώνα της Σαντορίνης αφού οι τρύγοι των τελευταίων ετών διεξάγονται όλο και πιο πρώιμα. Η αύξηση του pH στην εφαρμογή του καολίνη βέβαια αποτελεί αρνητικό παράγοντα για την παλαίωση του οίνου. Το Ασύρτικο είναι μια ποικιλία σημαντικά ευοξειδωτη. Τα θετικά αποτελέσματα στην αύξηση των φαινολικών στα δείγματα του καολίνη καθώς και της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά για την οινοποίηση αυτών. Εντούτοις, η δράση του καολίνη έχει συσχετιστεί και με άλλους παράγοντες, όπως το υδατικό στρες και τη θερμοκρασία, γι αυτό απαιτείται επανάληψη της μελέτης σε επόμενη καλλιεργητική περίοδο. Απαραίτητη θα ήταν και η εφαρμογή οινοποιήσεων και οργάνωσης πάνελ δοκιμαστών προκειμένου να συγκριθεί ο μάρτυρας με τον καολίνη και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του παραγόμενου οίνου.

5. Βιβλιογραφία

- Archana, S., Prabakar, K., Raguchander, T., Hubballi, M., Valarmathi, P., & Prakasam, V. (2011). Defense responses of grapevine to *Plasmopara viticola* induced by azoxystrobin and *Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Sustainable Agriculture*, 3, 30-38.
- Attia F. 2007. Effet du stress hydrique sur le comportement écophysiologique et la maturité phénolique de la vigne *Vitis vinifera* L.: étude de cinq cépages autochtones de midi-Pyrenees (Doctoral dissertation).
- Braidot, E., Zancani, M., Petrusa, E., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S., ... & Vianello, A. (2008). Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant signaling & behavior*, 3(9), 626-632.
- Cheynier, V., Dueñas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J. M., Sarni-Manchado, P., & Fulcrand, H. (2006). Structure and properties of wine pigments and tannins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 298-305.
compounds in Merlot grape (*Vitis vinifera* L.). *Food chemistry*, 134(2), 841-850.
- Conde, A., Pimentel, D., Neves, A., Dinis, L. T., Bernardo, S., Correia, C. M., & Moutinho-Pereira, J. (2016). Kaolin foliar application has a stimulatory effect on phenylpropanoid and flavonoid pathways in grape berries. *Frontiers in plant science*, 7, 1150.
- Coniberti, A., Ferrari, V., Dellacassa, E., Boido, E., Carrau, F., Gepp, V., & Disegna, E. (2013). Kaolin over sun-exposed fruit affects berry temperature, must composition and wine sensory attributes of Sauvignon blanc. *European journal of agronomy*, 50, 75-81.
- Constant, N. (2007). Amélioration des méthodes de lutte contre l'oïdium en viticulture biologique. *Synthèse bibliographique–document AIVB Languedoc-Roussillon* 18p.
- Coombe, B. G. (1995). Growth stages of the grapevine: adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 1(2), 104-110
- Daniel, C., Schärer, H. J., & Cahenzli, F. (2016). Influence de certains produits minéraux sur la vinification.
- De Orduna, R. M. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International*, 43(7), 1844-1855.
- Dinis, L. T., Bernardo, S., Conde, A., Pimentel, D., Ferreira, H., Félix, L., ... & Moutinho-Pereira, J. (2016b). Kaolin exogenous application boosts antioxidant capacity and phenolic content in berries and leaves of grapevine under summer stress. *Journal of plant physiology*, 191, 45-53.

- Dinis, L. T., Ferreira, H., Pinto, G., Bernardo, S., Correia, C. M., & Moutinho-Pereira, J. (2016a). Kaolin-based, foliar reflective film protects photosystem II structure and function in grapevine leaves exposed to heat and high solar radiation. *Photosynthetica*, 54(1), 47-55.
- Downey, M. O., Dokoozlian, N. K., & Krstic, M. P. (2006). Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 257-268.
- DOWNEY, M. O., HARVEY, J. S., & Robinson, S. P. (2003). Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9(1), 15-27.
- Downey, M. O., Harvey, J. S., & Robinson, S. P. (2003). Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9(2), 110-121.
- Downey, M. O., Harvey, J. S., & Robinson, S. P. (2004). The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10(1), 55-73.
- Evans, J. R. (1989). Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C 3 plants. *Oecologia*, 78(1), 9-19.
- Fang, F., Li, J. -M., Zhang, P., Tang, K., Wang, W., Pan, Q. -H., et al. (2008). variety, harvest date, fermentation vessel and wine ageing on flavonoid concentration in red wines. *Food Research International*, 41(1), 53–60.
- Garrido, J., & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols—A chemical perspective. *Food research international*, 54(2), 1844-1858.
- Glenn, D. M., Cooley, N., Walker, R., Clingeleffer, P., & Shellie, K. (2010). Impact of kaolin particle film and water deficit on wine grape water use efficiency and plant water relations. *HortScience*, 45(8), 1178-1187.
- Glenn, D.M. 2009. Particle film mechanisms of action that reduce the effect of environmental stress in 'Empire' apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 134:314–321
- Glenn, D.M., G.J. Puterka, S.R. Drake, T.R. Unruh, P. Baherele, E. Prado, and T. Baugher. 2001. Particle film application influences apple leaf physiology, fruit yield, and fruit quality. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126:175–181.
- Glenn, D.M., R. Scorza, and C. Bassett. 2000. Physiological and morphological traits associated with increased water use efficiency in the willow-leaf peach. *HortSci.* 35:1241–1243.
- Gutha, L. R., Casassa, L. F., Harbertson, J. F., & Naidu, R. A. (2010). Modulation of flavonoid biosynthetic pathway genes and anthocyanins due to virus infection in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. *BMC Plant Biology*, 10(1), 187.

- Harbertson, J. F., Kennedy, J. A., & Adams, D. O. (2002). Tannin in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot noir berries during ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53(1), 54-59.
- Jeffery, D. W., Parker, M., & Smith, P. A. (2008). Flavonol composition of Australian red and white wines determined by high-performance liquid chromatography. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 14(3), 153-161.
- Katsaros D, Pechoux P. Y. 1988. Vignes et vins en Grèce. *Méditerranée*, 65(3).
- Keller, M. 2010. *The Science of Grapevines: Anatomy and Physiology*. Academic Press, Burlington, Massachusetts.
- Kennedy, J. 2002. Understanding grape berry development. *Practical Winery and Vineyard*. July/August.
- Kennedy, J. A. (2008). Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. *Ciencia e investigación agraria*, 35(2), 107-120.
- Kennedy, J. A., Hayasaka, Y., Vidal, S., Waters, E. J., & Jones, G. P. (2001). Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5348-5355.
- Kennedy, J. A., Matthews, M. A., & Waterhouse, A. L. (2002). Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53(4), 268-274.
- Kliewer W. M, Lider L. A. 1970. Effects of day temperature and light intensity on growth and composition of *Vitis vinifera* L. fruits. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 95, 766-9.
- Koyama, K., & Goto-Yamamoto, N. (2008). Bunch shading during different developmental stages affects the phenolic biosynthesis in berry skins of 'Cabernet Sauvignon' grapes. *Journal of the American Society for horticultural Science*, 133(6), 743-753.
- Lobos, G. A., Acevedo-Opazo, C., Guajardo-Moreno, A., Valdés-Gómez, H., Taylor, J. A., & Laurie, V. F. (2015). Effects of kaolin-based particle film and fruit zone netting on Cabernet Sauvignon grapevine physiology and fruit quality. *OENO One*, 49(2), 137-144.
- Makris, D. P., Kallithraka, S., & Kefalas, P. (2006). Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *Journal of food composition and analysis*, 19(5), 396-404.
- Malien-Aubert, C., Dangles, O., & Amiot, M. J. (2002). Influence of procyanidins on the color stability of oenin solutions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(11), 3299-3305.
- Mateus, N., Silva, A. M., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C., & de Freitas, V. (2002). Identification of anthocyanin-flavanol pigments in red wines by NMR and mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 2110-2116.

- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., & Velasco, R. (2006). Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(20), 7692-7702.
- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2006). Evolution of the phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle. *Food Chemistry*, 95(3), 405-412.
- MULLINS M.G., BOUQUET A., WILLIAMS L.E., 1992. Biology of Horticultural crops. Biology of the grapevine. Press Syndicate of the University of Cambridge, στο 7 σελ. 9
- Pourcel, L., Routaboul, J. M., Cheynier, V., Lepiniec, L., & Debeaujon, I. (2007). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in plant science*, 12(1), 29-36.
- RIBEREAU-GAYON P., DUBOURDIEU D., DONECHE B., LONVAUD A., 2006. Handbook of Enology, Volume 1, The Microbiology of Wine and Vinifications. Ed: 2nd John Wiley & Sons, Ltd, 43, 66, 243, 244 255, 256
- Ristic, R., Downey, M. O., Iland, P. G., Bindon, K., Francis, I. L., Herderich, M., & Robinson, S. P. (2007). Exclusion of sunlight from Shiraz grapes alters wine colour, tannin and sensory properties. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 13(2), 53-65.
- Roby, G., Harbertson, J. F., Adams, D. A., & Matthews, M. A. (2004). Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition: anthocyanins and tannins. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10(2), 100-107.
- Rusjan, D., Halbwirth, H., Stich, K., Mikulič-Petkovšek, M., & Veberič, R. (2012). Biochemical response of grapevine variety 'Chardonnay' (*Vitis vinifera* L.) to infection with grapevine yellows (Bois noir). *European journal of plant pathology*, 134(2), 231-237.
- Sabir A. 2016. Vegetative and Reproductive Growth Responses of Grapevine cv.'Italia' (*Vitis vinifera* L.) Grafted on Different Rootstocks to Contrasting Soil Water Status. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18(6), 1681-1692.
- Schultz H. R, Jones, G. V. 2010. Climate induced historic and future changes in viticulture. *Journal of Wine Research*, 21(2-3), 137-145
- Shellie, K. (2015). Foliar reflective film and water deficit increase anthocyanin to soluble solids ratio during berry ripening in Merlot. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66(3), 348-356.
- Shellie, K. and D.M. Glenn. 2008. Wine grape response to foliar particle film under differing levels of pre-veraison water stress. *HortScience* 43:1392–1397
- Shellie, K., & Glenn, D. M. (2008). Wine grape response to foliar particle film under differing levels of preveraison water stress. *HortScience*, 43(5), 1392-1397.

- Song, J., Shellie, K. C., Wang, H., & Qian, M. C. (2012). Influence of deficit irrigation and kaolin particle film on grape composition and volatile
- Spayd, S. E., Tarara, J. M., Mee, D. L., & Ferguson, J. C. (2002). Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53(3), 171-182.
- Stines, A. P., Grubb, J., Gockowiak, H., Henschke, P. A., Høj, P. B., & Van Heeswijck, R. (2000). Proline and arginine accumulation in developing berries of *Vitis vinifera* L. in Australian vineyards: Influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(2), 150-158.
- Taiz L, Zeiger E. 2012. Φυσιολογία Φυτών. Utopia, Αθήνα
- Tubajika, K. M., Civerolo, E. L., Puterka, G. J., Hashim, J. M., & Luvisi, D. A. (2007). The effects of kaolin, harpin, and imidacloprid on development of Pierce's disease in grape. *Crop protection*, 26(2), 92-99.
- Winkler, A.J., J.A. Cook, W.M. Kliewer, and L.A. Lider. 1974. General Viticulture. Univ. of California Press. Berkeley, California.
- Zouid Imen. Etude de l' evolution et de l' extractibilite des composes phenoliques du raisin en milieu hydroalcoolique pendant la maturation-lien avec le proprietes mecaniques de la. Sciences agricoles. Université d'Angers, 2011. Français. tel-00799029
- Αϊβαλακίς Γ, Καραμπουρνιώτης Γ, Φασσέας Κ. 2005. Γενική Βοτανική. Η Μορφολογία, η Ανατομία και η Φυσιολογία των Ανώτερων φυτών. εκδ. Έμβρυο
- Γεωργίου Κ, Θάνος Κ, Ριζοπούλου Σ, Μελετίου-Χρήστου ΜΣ. 2012. Οικοφυσιολογία Φυτών. Δίαυλος, Αθήνα.
- Κανάκης Ι. 2007. Επίδραση των υδατικών σχέσεων στην ποσότητα και ποιότητα των αμπελουργικών προϊόντων της οινοποιήσιμης ποικιλίας Syrah (*Vitis vinifera* L.), σε συνθήκες αμπελώνα. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα
- Κοτσερίδης Γ. 2005α. Σημειώσεις /Εργαστηριακές Ασκήσεις Οινολογίας Ι, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα
- Κουράκου - Δραγώνα Σ. 2015. Σαντορίνη Ιστορικό Οινοπεδίο. Εκδόσεις του Φοίνικα, Αθήνα
- Μελετίου-Χρήστου ΜΣ. Σημειώσεις μεταβολισμού φυτών 2008, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, τμήμα Βιολογίας/τομέας Βοτανικής, Αθήνα 2008
- Ξυράφης, Ε. Γ. (2019). Μελέτη της επίδρασης του Διαφυλλικού ψεκασμού με καολίνη στην ποικιλία Ασύρτικο (*Vitis vinifera* L.) σε συνθήκες αμπελώνα.
- Σουφλερός Ε. ΗΡ., 1997. Οινολογία. Επιστήμη και Τεχνολογία, Τόμος Ι. Θεσσαλονίκη, 66, 191, 205
- Σταυρακάκης Μανώλης Ν. 2013. Αμπελουργία. Εκδόσεις Τροπή.

- Στυλιανού, Μ. Α., & Styliανου, Μ. Α. (2012). Απομάκρυνση βαρέων μετάλλων από υδατικά διαλύματα με χρήση φυσικών ορυκτών.